

ORSAY
Marie A. N°
D'ordre
688

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS-SCIENCES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITÉ DE PARIS

par

Marie-Claire LEBEAU

pour obtenir

le grade de Docteur ès-sciences

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES STÉROIDES SULFOCONJUGUÉS D'ORIGINE SURRÉNALIENNE

Soutenue devant la Commission d'Examen le 16 Septembre 1970

MM. E. LEDERER Président
H. CLAUSER Rapporteur
E. BAULIEU

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS-SCIENCES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITÉ DE PARIS

par

Marie-Claire LEBEAU

pour obtenir

le grade de Docteur ès-sciences

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES STÉROIDES SULFOCONJUGUÉS
D'ORIGINE SURRÉNALIENNE**

Soutenue devant la Commission d'Examen le 16 Septembre 1970

**MM. E. LEDERER Président
H. CLAUSER Rapporteur
E. BAULIEU**

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ES-SCIENCES

présentée

À LA FACULTÉ DES SCIENCES PHYSIQUES

L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PAR

Mlle Claire LEBEAU



CONTRIBUTION À L'ÉTUDE

DES ÉLÉMENTS GÉOMÉTRIQUES

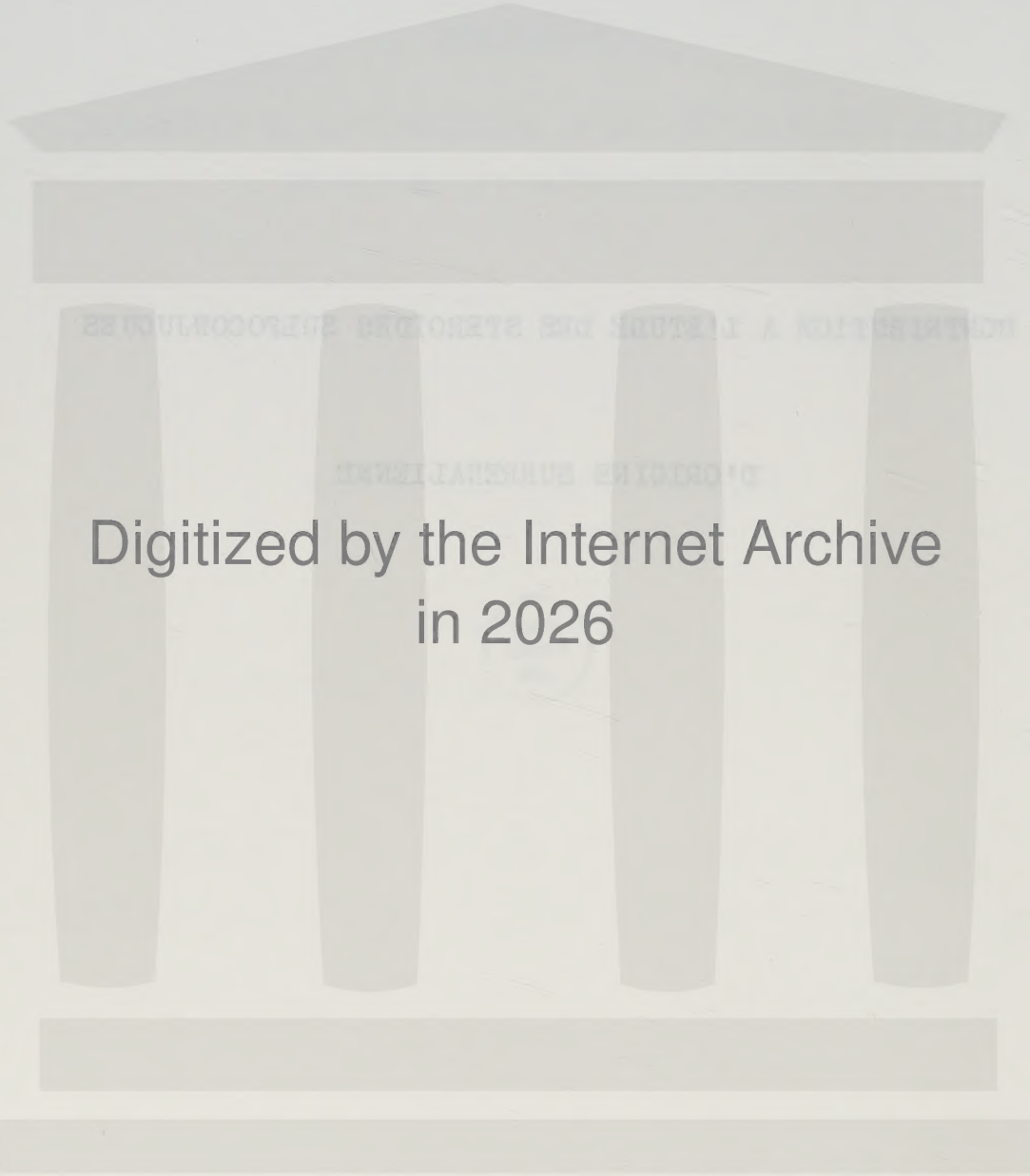
GÉNÉRAUX

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier M. Baillou qui a dirigé le travail
scientifique dans cette thèse et qui m'a constamment encouragé et
conseillé, M. Lédarier qui a accepté de présider le jury et
M. Chassier qui a bien voulu en être le rapporteur, Mes Chri-
stine Kervin-Picard, Michel Marie-Alexandre et Lucie Carmon,
mes amis, pour leur accueil et leur sympathie, M. et Mme
Simon Dubois et Michel Dubois pour leur précieuse collaboration,
et Mes Danièle Dubois et M. Dubois qui ont assuré la dactylographie de
mon manuscrit.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES STEROIDES SULFOCONJUGUES

D'ORIGINE SURRENALIENNE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551504_0013

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier M. Baulieu qui a dirigé le travail décrit dans cette thèse et qui m'a constamment encouragée et conseillée, M. Lederer qui a accepté de présider le jury et M. Clauser qui a bien voulu en être le rapporteur, Mme Christine Mercier-Bodard, Melles Audrey Alberga et Paméla Carson, MM. Roméo Emiliozzi, Jean-Pierre Raynaud, Paul Robel et MM. Simon Calvo et Michel Renoir pour leur précieuse collaboration, et Mme Danielle Prod'homme qui a assuré la dactylographie du manuscrit.

LISTE DES PUBLICATIONS

- M.C. LEBEAU and E.E. BAULIEU : In vitro biosynthesis of corticosteroid sulfates by adrenal tumoral tissue.
Endocrinology, 73, 832, 1963
- M.C. LEBEAU et E.E. BAULIEU : Métabolisme, production et sécrétion du sulfate de corticostérone.
C.R. Acad. Sci. Paris, 258, 6265, 1964
- M.C. LEBEAU, A. ALBERGA and E.E. BAULIEU : Adrenal biosynthesis of dehydroisoandrosterone sulfate.
Biochem. Biophys. Res. Com., 17, 570, 1964
- M.C. LEBEAU et E.E. BAULIEU : Contribution du cholestérol et du sulfate de cholestérol circulants à la biosynthèse des hormones testiculaires et corticosurrénaliennes.
C.R. Acad. Sci. Paris, 263, 158, 1966
- M.C. LEBEAU, C. MERCIER-BODARD, J. OLDS, D. BOURQUIN, T. BRECY, J.P. RAYNAUD et E.E. BAULIEU: Mesure de la liaison de la corticostérone, du sulfate de corticostérone, de la testostérone et de l'oestradiol à des protéines du plasma.
Annales d'Endocrinologie, Paris, 30, 183, 1969
- M.C. LEBEAU and E.E. BAULIEU : Binding of steroid conjugates to Human Corticosteroid Binding Globulin.
J. Clin. Endocr. Metab., 30, 166, 1970

LISTE DES APPELLATIONS COURANTES ET ABREVIATIONS

- Déhydroépiandrostérone (DHA) : 3β -hydroxy-androsta-5-ène-17-one
- Testostérone (T) : 17β -hydroxy-androsta-4-ène-3-one
- Androstérone (Andro) : 3α -hydroxy- 5α -androstane-17-one
- Etiocholanolone (Etio) : 3α -hydroxy- 5β -androstane-17-one
- Oestrone (O_I) : 3-hydroxy-estra-1,3,5⁽¹⁰⁾-triène-17-one
- Δ_5 -prégnénolone (Δ_5P) : 3β -hydroxy-prégna-5-ène-20-one
- 17-hydroxyprégnénolone (17OH-P) : $3\beta, 17\alpha$ -dihydroxyprégna-5-ène-20-one
- Progestérone (P) : préгна-4-ène-3,20-dione
- Corticostérone (B) : $11\beta, 21$ -dihydroxyprégna-4-ène-3,20-dione
- Cortisol (F) : $11\beta, 17\alpha, 21$ -trihydroxyprégna-4-ène-3,20-dione
- Cortisone (E) : $17\alpha, 21$ -dihydroxy-prégna-4-ène-3,11,20-trione
- Tétrahydrocorticostérone (THB, TB) : $3\alpha, 11\beta, 21$ -trihydroxy- 5β -prégnane-20-one
- Tétrahydrocortisol (THF, TF) : $3\alpha, 11\beta, 17\alpha, 21$ -tétrahydroxy- 5β -prégnane-20-one
- Tétrahydrocortisone (THE, TE) : $3\alpha, 17\alpha, 21$ -trihydroxy- 5β -prégnane-11,20-dione
- Sulfate (S) : ester sulfate
- Glucuronide (G) : β D-glucopyranuroside

I N T R O D U C T I O N

Le problème des dérivés sulfoconjugués des hormones intéresse les biochimistes depuis de longues années. Ces esters sulfates ont d'abord été considérés comme des métabolites inactifs des hormones, destinés uniquement à l'excrétion urinaire ; au cours de ces 10 dernières années, on a découvert que certains de ces sulfates sont sécrétés par les glandes (3,5,6,38,54,61,120,121) qu'ils peuvent être métabolisés (8,9,18,19) et l'on recherche quel peut être leur rôle physiologique (9,11,65,70).

Le plus important de ces sulfoconjugués sur le plan quantitatif le sulfate de déhydroépiandrostérone^o, a été mis en évidence dans l'urine par Munson, Gallagher et Koch (1944) (74), puis dans le sang après hydrolyse par Migeon et Plager (1954) (69) et Lieberman et Dobriner (1948) (66) et enfin dans le plasma sous forme sulfoconjuguée par Baulieu (1960) (5). Baulieu (6) et Wieland et Hirschman (120) ont alors décrit la sécrétion du sulfate de déhydroépiandrostérone par des surrénales tumorales et normales en comparant les taux de ce sulfate dans le sang veineux surrénalien et le sang veineux périphérique. Ces derniers auteurs (121) ont démontré de la même manière une sécrétion surrénalienne probable de sulfate de 17-hydroxyprégnénolone. Dans des expériences de dilution isotopique Fukushima et Gallagher (38) et Arcos, Gurpide, Van de Wiele et Lieberman (3) ont observé que certains métabolites urinaires sulfoconjugués d'hormones surrénaliennes avaient des activités spécifiques beaucoup plus basses que les métabolites glucuroconjugués correspondants. Ils ont été amenés à faire l'hypothèse d'une sécrétion de sulfate de 17-hydroxyprégnénolone^c(38)

^o Voir liste des appellations et abreviations.

et de sulfate de prégénolone° (3) qui viendraient diluer uniquement les métabolites urinaires sulfoconjugués. Ayant obtenu des résultats semblables après une injection de corticostérone° marquée à un homme normal (61), nous avons prévu une éventuelle sécrétion surrénalienne de sulfate de corticostérone, hypothèse qui semble confirmée par les travaux de Giroud et coll. (54).

Seule la sécrétion de sulfate de déhydroépiandrostérone a été démontrée indiscutablement, car elle est très importante quantitativement, mais il est possible que d'autres stéroïdes sulfoconjugués soient sécrétés en quantité plus faible, ou dans certaines circonstances déterminées (naissance, pathologie..).

Dans la surrénale, la voie de biosynthèse des hormones libres est bien connue (14,31,51,58,68) et l'on sait que le cholestérol, précurseur principal, perd sa chaîne latérale pour donner la prégénolone (21,40,103,109), elle-même pouvant être transformée d'une part en progestérone° puis en corticostérone (31,57,108,113), d'autre part en 17-hydroxyprégénolone, et que ce stéroïde peut donner naissance soit au cortisol° (73,112) soit aux androgènes surrénaliens (25,89,107) (fig.1). Le cortisol, la corticostérone et la déhydroépiandrostérone, produits terminaux de cette biosynthèse, sont alors sécrétés par la glande.

La découverte d'une très importante sécrétion de déhydroépiandrostérone sulfoconjuguée (5,6) et d'une sécrétion possible d'autres sulfates (54,121), permet d'imaginer l'existence dans la surrénale d'une ou de plusieurs voies de biosynthèse des sulfates, parallèles à celle des hormones libres (fig. 1, fig. 1bis).

Les caractères liposoluble des stéroïdes neutres et hydrosoluble de leurs sulfates font penser que ces deux types de stéroïdes peuvent être métabolisés différemment ; cela serait dû soit à

Figure 1 bis

Biosynthèse des stéroïdes surrénaliens : hypothétique
"voie des sulfates" (en noir), les sulfates de 3β -hydroxy
 Δ_5 stéroïdes jouant un rôle central (d'après Baulieu et al (10)).

Pour les abréviations, voir liste des appellations courantes.

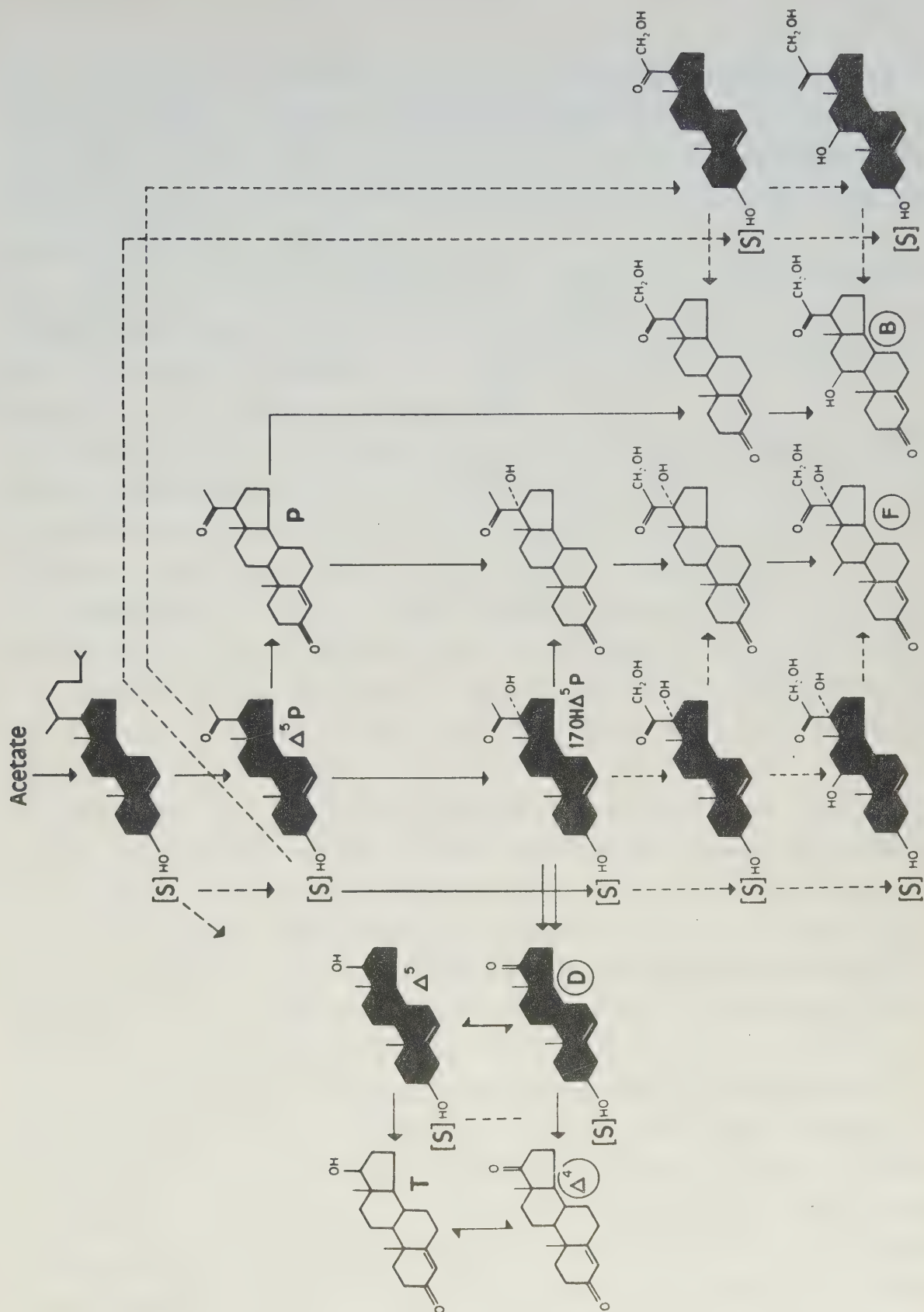
Δ_5 = Δ_5 -diol

D = déhydroépiandrosterone

Δ_4 = Δ_4 -androstènedione

Les produits sécrétés par la glande surrénale sont entourés
d'un cercle.

Acetate



une différence de pénétration (et/ou distribution) dans les différents compartiments subcellulaires, soit à une différence de spécificité au niveau des enzymes, celles transformant les stéroïdes neutres n'étant pas nécessairement les mêmes que celles transformant les sulfates.

Il nous a paru intéressant de voir si de telles voies de biosynthèse des stéroïdes sulfoconjugués existaient dans la surrénale tumorale ou normale, et si oui, juger de leur importance. Pour cela il fallait, entre autres,

- 1) démontrer que les enzymes capables de sulfoconjuguier les stéroïdes impliqués dans la biosynthèse des hormones existent dans la surrénale, et que les sulfoconjugués peuvent s'y former. Certaines de ces réactions sont décrites au chapitre I.
- 2) démontrer que les stéroïdes sulfoconjugués existent normalement dans le tissu surrénalien et le plasma. Le dosage du sulfate de cholestérol plasmatique et du sulfate de corticostérone dans le plasma, le tissu surrénalien et l'urine sont décrits au chapitre II.
- 3) démontrer que les stéroïdes peuvent être métabolisés sous leur forme sulfoconjuguée par les enzymes surrénaliens, et comparer le rendement de ces transformations à celui du métabolisme des stéroïdes neutres analogues. La transformation du sulfate de 17-hydroxypregnénolone en sulfate de déhydroépiandrostérone et le métabolisme du sulfate de cholestérol dans la surrénale sont décrits dans le chapitre III.
- 4) nous démontrons la liaison des stéroïdes sulfoconjugués à certaines protéines plasmatiques de transport. Ceci pourrait expliquer en partie le rôle physiologique des sulfates de stéroïdes, puisqu'en se liant aux protéines qui transportent spécifiquement les hormones libres (par exemple la transcortine) et en déplaçant les hormones de leurs sites de liaison, ils pourraient exercer une régulation sur les taux d'hormones actives circulantes.

Dans ce travail où il est question à la fois de stéroïdes sulfoconjugués et "libres", et de stéroïdes liés ou non à des protéines, il est nécessaire de préciser ce que l'on entend par ces formes de conjugaison. Lorsqu'un stéroïde est sulfoconjugué, il y a formation d'une liaison ester entre une fonction alcool secondaire de la molécule stéroïdienne (les hydroxyles les plus réactifs se trouvant sur les carbones 3, 17 et 21) et l'acide sulfurique du milieu, la réaction pouvant être catalysée enzymatiquement ou chimiquement. Il s'agit donc d'une liaison covalente, labile dans les acides dilués et en présence de certains solvants organiques à pH acide.

Dans la liaison protéine-stéroïde, il s'agit d'interactions non covalentes et de faible énergie, et comme la réaction est réversible il existe perpétuellement un équilibre entre la forme liée et non liée du stéroïde. Il est évident que ces interactions sont perturbées par toute rupture de l'équilibre, par exemple lorsqu'on sépare le ligand lié à la protéine du ligand non lié (voir Techniques D,6).

Les techniques employées dans ce travail sont décrites en fin de texte, p. 100.

CHAPITRE .I.

SULFOCONJUGAISON DE STEROIDES DANS LES GLANDES SURRENALES.

A - Sulfoconjugaison de stéroïdes in vitro par la fraction soluble d'un homogénat de tumeur surrénale.

La première étape dans l'étude du métabolisme des sulfates de stéroïdes était la mise en évidence de la formation d'esters sulfates de stéroïdes dans la glande surrénale. Les produits intermédiaires du métabolisme des hormones libres pouvaient-ils servir de substrats aux sulfotransférases de la surrénale et quelles étaient les affinités de ces enzymes pour les divers stéroïdes ?

Nous avons préparé des fractions ayant l'activité sulfotransférase à partir d'une tumeur surrénalienne et les avons incubées avec des stéroïdes susceptibles d'intervenir dans la voie de biosynthèse des hormones (60). Le tissu tumoral a été choisi parce qu'il sécrète énormément de sulfate de déhydroépiandrosterone (5) et contient donc probablement de grandes quantités de sulfotransférases (110), et parce que chez l'homme il est plus facile à obtenir que du tissu normal.

Le surnageant contenant les sulfotransférases a été préparé selon la technique de Wengle et Boström (114) avec quelques modifications suggérées par les travaux de De Meio et coll. (28), et de Roy (94). Ces auteurs ont observé une sulfoconjugaison de la déhydroépiandrosterone, de la testostérone, de l'oestrone et de l'oestradiol 17β dans des incubations de surnageant de foie, et ont décrit les co-facteurs et conditions nécessaires à l'activité des sulfotransférases.

1° - Préparation du surnageant

300 g d'une tumeur de la surrénale prélevée à un homme jeune et dont l'excrétion urinaire de 17-oxostéroïdes était de 200 mg/j, ont été homogénéisés dans 2 volumes de KCl 0,15 M, pH 7,0, contenant 0,001 M EDTA. Cet homogénat a été centrifugé 20 min. à 2500 g puis le surnageant centrifugé de nouveau pendant 1 heure à 80000 g. Le surnageant qui contenait 14 mg/ml de protéines (dosage d'azote par la méthode de Kjeldahl) a été conservé pendant plusieurs mois à -20°. Il ne devait plus renfermer de sulfatases, puisque celles-ci sont microsomiales (17).

2° - Incubations

Les stéroïdes sont mis en solution dans 1 ml du milieu d'incubation composé de quantités égales de :

- tampon phosphate de sodium et potassium 0,3 M pH 6,8
- K_2SO_4 0,03 M
- $MgCl_2$ 0,005 M

Puis 0,4 ml d'une solution d'ATP 0,002 M dans l'eau et 1 ml de surnageant actif sont ajoutés. Après 2 heures d'incubation dans de flacons ouverts et à 37°, la réaction est arrêtée par l'adjonction de 10 ml d'alcool absolu. Pour tenter d'améliorer le rendement de la sulfoconjugaison les stéroïdes ont été dissous dans 0,1 ml de propanediol : l'effet est minime.

3° - Extractions

Les protéines précipitées par l'alcool sont filtrées, le résidu lavé avec 3 fois 30 ml d'un mélange acétone-éthanol-chloroforme 1:1:1, et le filtrat et les lavages mis à sec. Le résidu est repris par 50 ml d'eau et extrait par 3 fois 100 ml de dichlorométhane, lavé à l'eau et les phases aqueuse et organique mises à sec. La phase organique contient les stéroïdes libres et la phase aqueuse les sulfoconjugués hydrosolubles. Cette technique de partage est très efficace et les expériences négatives au point de vue sulfoconjugaison ont démontré que 99 % du stéroïde libre étaient retrouvés dans la phase organique ; dans une expérience où l'on a incubé du sulfate de déhydroépiandrosterone- H^3 afin d'étudier

son hydrolyse dans les conditions d'incubation employées, 1 % de la radioactivité a été retrouvé dans le dichlorométhane. De la radioactivité due au composé libre n'a été retrouvée dans la phase aqueuse que dans le cas du cholestérol. Dans toutes les incubations la radioactivité extraite représente 80 à 100 % de la radioactivité incubée.

4° - Purification des sulfates

Le résidu provenant de la phase aqueuse est purifié par chromatographie de partage sur colonne de célite dans le système de solvants H. Les stéroïdes libres, s'il en reste une trace dans cette fraction, sont élués dans le 1er volume de rétention, et les sulfates apparaissent dans un seul pic vers le 4ème au 6ème volume de rétention (voir Techniques A,9,b). Le rendement de la sulfoconjugaison est calculé à partir de la radioactivité éluee dans ce pic.

5° - Identification des sulfates de stéroïdes

Comme dans la plupart des cas la chromatographie des composés hydrosolubles ne montrait qu'un seul pic radioactif, il est probable qu'il s'agissait du stéroïde initial, sulfoconjugué. Pour prouver que l'on était bien en présence d'un monosulfate, ce pic a été chromatographié sur papier dans les systèmes 8-11. Les sulfates ont enfin été soumis à une hydrolyse enzymatique (sulfatase purifiée d'*Helix Pomatia*) ou à une solvolysse (Techniques A,4, a et b). Les stéroïdes libérés ont été chromatographiés sur papier dans les systèmes de solvants appropriés et comparés à des témoins.

6° - Résultats

Les incubations ont été faites au moins en double et ont donné chaque fois des résultats semblables, qui figurent dans le tableau I. Dans la série A, la corticostérone et la 11-desoxycorticostérone sont davantage sulfoconjuguées en C21 que le cortisol et la cortisone. La déhydroépiandrostérone est le meilleur substrat des sul-

Tableau I

<u>Stéroïdes incubés</u>	<u>Activité spécifique</u>	<u>µg incubés</u>	<u>cpm totaux récupérés</u>	<u>cpm phase aqueuse</u>	<u>% sulfates formés °</u>
A) <u>Stéroïdes sulfates en C₂₁</u>					
	$\frac{C_{11}}{\beta OH}$	$\frac{C_{17}}{\alpha OH}$			
cortisol 4-C ¹⁴	69	5,3	338000	28000	11
	$\beta c.l.$	$\beta c.l.$			
cortisone 4-C ¹⁴	=0	70,5	361000	81000	9
	αOH	6,3			
	$\beta c.l.$				
11-desoxycortisol 1,2-H ³	2000	0,6	475000	265000	39
	αOH				
	$\beta c.l.$				
corticostérone 1,2-H ³	158000	0,04	2130000	1700000	71
	βOH				
	$\alpha-H$				
	$\beta c.l.$				
11-desoxycorticostérone 1,2-H ³	110000	0,016	559000	464000	74
	$\alpha-H$				
	$\beta c.l.$				
B) <u>Stéroïdes sulfates en C₁₇</u>					
17OH-pregnénolone 7 α H ³	40000	0,03	406000	357000	68
	$\frac{C_{17}}{\alpha OH}$				
	$\beta c.l.$				
pregnénolone 16-H ³	5000	0,27	429000	370000	70
	$\alpha-H$				
	$\beta c.l.$				
Déhydroépiandrostérone 7 α H ³	= 0	0,18	619000	603000	98
Testostérone 1,2-H ³	150000	0,03	174000	139000	44
	βOH				

° sulfates formés = cpm sulfates isolés par chromatographie/cpm totaux récupérés

° c.l. = chaîne latérale

°° les incubations n'ont pas été faites en même temps que les autres, qui, elles, sont simultanées. °

fotransférases mais la prégnénolone et la 17-hydroxyprégnénolone sont également conjuguées avec un bon rendement. La testostérone est sulfoconjuguée en 17β , mais avec un moins bon rendement que la prégnénolone qui a été incubée dans les mêmes conditions et à concentration égale. Aucun sulfate n'a été formé à partir de cholestérol et de 17-hydroxyprogestérone. La cinétique des réactions enzymatiques n'a pas été étudiée, et il s'agit ici uniquement de résultats globaux. D'autre part, les concentrations disparates de stéroïdes incubés ainsi que ce stéroïdes endogènes éventuellement présents dans le surnageant rendent difficile une interprétation de ces résultats. Il a été tiré cependant de cette expérience, certaines informations qui concordent avec les résultats obtenus par d'autres auteurs (1,77,104,115).

Adams (1) a démontré que dans un surnageant de glandes surrénales humaines normales, la déhydroépiandrostérone et la testostérone étaient sulfoconjuguées, mais que le cholestérol ne l'était pas ; Schneider et Lewbart (104) et Nose et Lipmann (77) ont observé la sulfoconjugaison de la déhydroépiandrostérone, de la testostérone et de la prégnénolone mais aucune transformation du cholestérol par des sulfotransférases de foie de lapin. En ce qui concerne la 17-hydroxyprogestérone, Wengle et Boström (115) ont montré que par ordre de sulfoconjugaison croissante : 17-hydroxyprogestérone < testostérone (17β OH) < cistestostérone (17α OH). Il semble donc que la présence d'une chaîne latérale en 17β empêche l'estérification d'un hydroxyle en 17α , et dans notre expérience la présence d'un hydroxyle en 17α semble inhiber partiellement la sulfatation d'un hydroxyle en C21. Ceci est confirmé par les résultats de Adams (2) et de Schneider et Lewbart (104) qui trouvent que des sulfotransférases de surrénale humaine (2) et de foie de lapin (104) estérifient la 11-desoxycorticostérone, mais n'ont aucune action sur le cortisol et la cortisone.

Une tentative de préparation de sulfotransférases à partir de tissu rénal a été faite dans les mêmes conditions. Nous n'avons pas trouvé de sulfotransférases actives sur les stéroïdes, et c'est peut-être dû aux conditions de préparation qui ne sont pas adaptées au tissu rénal, mais c'est aussi ce qu'ont trouvé Nose et Lipman (77) et Boström et Wengle (15). Le seul exemple de sulfotransférase rénale active a été donné par Rice et coll. (87), qui ont mis en évidence la sulfatation du cholestérol par du "cytosol" de rein de Rat.

B - Préparation de stéroïdes sulfoconjugués radioactifs.

1° - marqués sur le noyau stéroïde

Exemple d'une préparation : $1,3 \cdot 10^6$ cpm de corticostérone $1,2 \text{ H}^3$ représentant 150 μg ont été incubés avec des quantités doubles de tampon, d'ATP et d'enzyme, et dans un volume total de 4,8ml. L'incubation à 37° a duré 2 heures et a été bloquée par l'adjonction d'alcool. Les méthodes d'extraction et de purification étaient les mêmes que dans les expériences faites avec des traceurs radioactifs.

Le résidu de la phase aqueuse contenant les sulfates et représentant 33 % de la radioactivité isolée, a été chromatographié sur célite dans le système H et la radioactivité ainsi que l'absorption à 240 m μ déterminées dans chaque tube (fig. 2). L'activité spécifique du sulfate était constante ($\text{SEM} \pm 0,34$ (9)) dans le pic élué au 7ème volume de rétention.

	<u>Poids (mesuré à 240 mμ)</u>	<u>Radioactivité</u>
Incubation	150 μg	1,340,000 cpm
Phase aqueuse	-	441,000 cpm (33%)
Conversion en sulfate	21 %	23 %

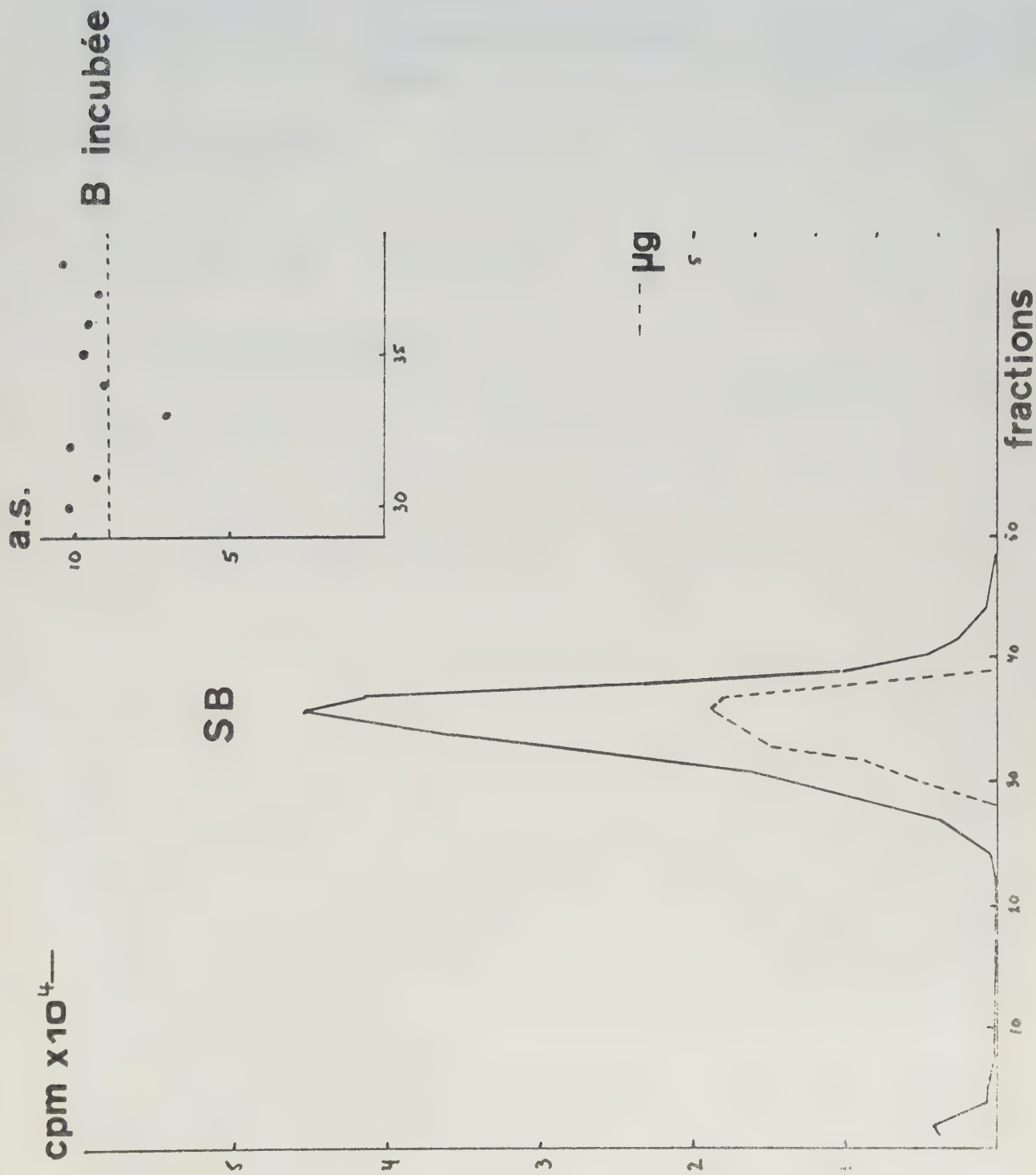
Stabilité du sulfate dans le milieu d'incubation

Pour démontrer que les sulfates formés ne subissaient pas d'hydrolyse au cours de l'incubation, un sulfate de stéroïde à 19 atomes de carbone (sulfate de déhydroépiandrosterone) et un sulfate de stéroïde à 21 atomes de carbone (sulfate de cortisol) ont été incubés

Figure 2

Sulfate de corticostérone- H^3 : chromatographie
sur colonne de célite dans le système H.

En insertion, activité spécifique du sulfoconjugué
en cpm/ μ g.



et extraits dans les mêmes conditions que les stéroïdes libres. Les résultats ont montré qu'il n'y avait peu ou pas d'hydrolyse dans les conditions expérimentales.

<u>Sulfate incubé</u>	<u>% radioactivité dans l'eau</u>	<u>% radioactivité dans le dichlorométhane</u>
Sulfate de DHA-H ³ (49,8 µc/mg)	98,5	1,5
Sulfate de cortisol, 1,2-H ³	97,4	2,6

2° - Marqués par le S³⁵

La réaction enzymatique permet de préparer des sulfates de stéroïdes marqués par le tritium ou le carbone sur la partie stéroïdique de la molécule, et de synthétiser également des dérivés sulfoconjugués marqués par le soufre 35 sur la copule sulfate.

Exemple d'une préparation : 10 mc d'acide sulfurique S³⁵ en solution dans l'acide chlorhydrique (CEA) ont été mis à sec au fond d'un erlenmeyer. Le résidu a été repris par 2,4 ml de tampon et de surnageant (comme au paragraphe A,2), contenant 30 µg de 17-hydroxyprégnénolone non radioactive. L'incubation et l'extraction ont été faites comme dans les expériences précédentes, et la phase aqueuse contenait toute la radioactivité (0,1 % dans la phase organique). Chromatographié sur papier dans le système 8, le composé radioactif migrait avec un R_F de 0,6. La zone radioactive a été éluee, et l'éluat chromatographié sur colonne de célite dans le système H. La radioactivité est apparue dans un seul grand pic qui migrait comme le sulfate de 17-hydroxyprégnénolone dans ce système de solvants.

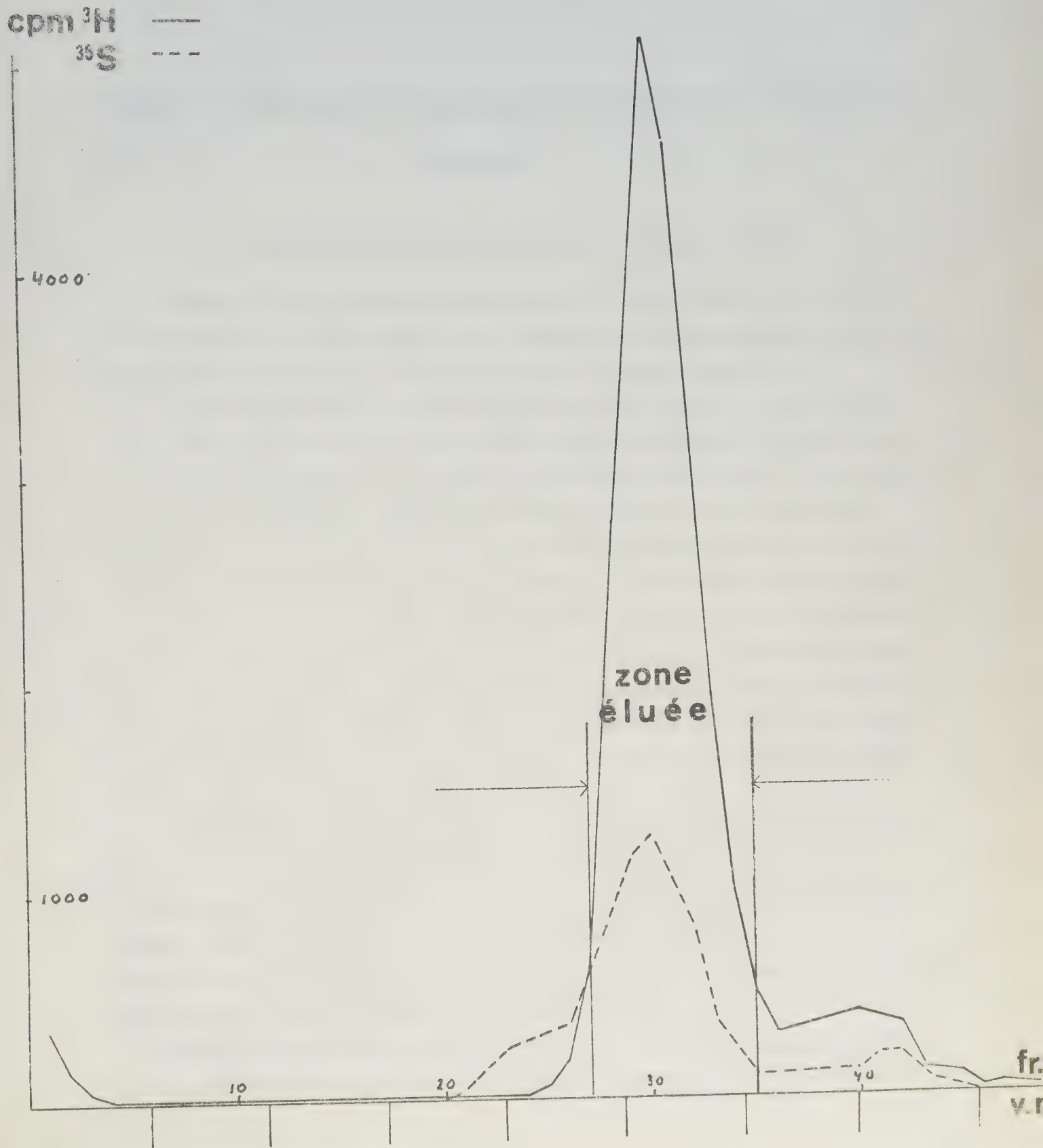
3° - Doublément marqués

Du sulfate S³⁵ de corticostérone a aussi été synthétisé de cette manière, puis a été mélangé à du sulfate de corticostérone, 1,2-H³ (fig. 3) ; avec ce composé doublement marqué on a pu mesurer le taux de sécrétion et de production du sulfate de corticostérone par la surrénale humaine (voir chapitre II,B).

Figure 3

Sulfate-S³⁵ de corticostérone-H³ : purification
sur colonne de célite dans le système H.

Sulfate-³⁵S de Corticostérone-³H



CHAPITRE .II.

MISE EN EVIDENCE DE STEROIDES SULFOCONJUGUES DANS LES TISSUS

NORMAUX.

A - Sulfate de cholestérol dans le plasma humain

Comme le sulfate de cholestérol pouvait être à l'origine d'une voie de biosynthèse des stéroïdes sulfoconjugués (fig. 1), nous avons cherché à l'isoler dans le plasma humain.

Du cholestérol et du sulfate de cholestérol radioactifs ont été ajoutés à doses traceuses comme marqueurs techniques à 100 ml de plasma. Le sulfate de cholestérol $7\alpha\text{H}^3$ (22 $\mu\text{C}/\mu\text{M}$) a servi à suivre la purification du sulfate de cholestérol endogène et à calculer les pertes expérimentales et le cholestérol 4-C^{14} a été ajouté pour vérifier l'élimination complète du cholestérol libre dans la fraction sulfate avant le dosage. Après $\frac{1}{2}$ heure d'incubation, les protéines ont été précipitées par l'alcool, et le cholestérol et son sulfate extraits par le chloroforme, puis séparés par la méthode de McKenna et Norymberski (Techniques A,3,a) ; 20 % du sulfate et 55 % du cholestérol libre ont été extraits.

Le sulfate de cholestérol a été chromatographié sur célite dans le système I, puis soumis à une hydrolyse enzymatique (Techniques 4,a), et le cholestérol libéré chromatographié sur plaque dans le système J. Le cholestérol tritié a alors été acétylé par de l'anhydride acétique 1-C^{14} et chromatographié en couche mince sur du Kieselgel G additionné de nitrate d'argent (8g AgNO_3 /30 g silicagel) (24) dans le système J, puis sur colonne d'alumine hydratée à 4 % et élué par de l'éther de pétrole

enrichi par le benzène selon un gradient convexe.

La quantité de sulfate de cholestérol contenue dans le plasma et calculée comme il est décrit dans le chapitre Techniques(1,12,3)d'après le tritium et le carbone-14 contenus dans l'acétate de cholestérol purifié, était de 0,6 mg/100 ml.

Drayer et Lieberman (33) ont trouvé 0,3 mg de sulfate de cholestérol par 100 ml de plasma humain, puis la même équipe l'année suivante a isolé 0,3 - 0,9 mg de sulfate de cholestérol/100 ml de plasma (44).

Bien que nous n'ayons pas obtenu de sulfoconjugaison du cholestérol avec des préparations de sulfotransférases surrénaliennes (chapitre I), ce sulfate a été isolé des surrénales bovines (32). Il a également été mis en évidence dans des calculs biliaires (33), les parois de vaisseaux sanguins et des tumeurs surrénaliennes (34), dans l'urine, la bile, les fecès, le rein, le foie et même dans le cerveau (71, 122). L'ubiquité du sulfate de cholestérol fait penser que, sous cette forme relativement hydrosoluble, le cholestérol pourrait être mis en réserve ou transporté dans des tissus qu'il n'aurait pu pénétrer autrement. Ce rôle paraît plus important que celui de précurseur des stéroïdes surrénaliens (voir chapitre III,B).

B - Sulfate de corticostérone dans l'urine, le tissu surrénalien et le plasma de l'Homme.

Le bon rendement (71 %) de sulfoconjugaison obtenu après incubation de corticostérone avec des sulfotransférases surrénaliennes (tableau 1), ainsi que les résultats de Pasqualini, qui, après injection d'ACTH (79) à un homme normal, a isolé de grandes quantités de sulfate de corticostérone dans les urines,

ont permis de penser que ce sulfate pouvait être, comme le sulfate de déhydroépiandrostérone, sécrété en quantité importante par la surrénale.

Le taux de production du sulfate de corticostérone a été mesuré par la méthode de double dilution isotopique. Ce travail ayant déjà fait l'objet d'un rapport (Diplôme d'Etudes Approfondies, Orsay 1966), seuls les résultats seront rappelés ici. La corticostérone libre circulante est sulfoconjuguée, ou réduite puis glucuro- ou sulfoconjuguée dans le foie et éliminée ainsi dans les urines. Le sulfate de corticostérone est éliminé dans les urines surtout sous forme de sulfate de corticostérone inchangé, en partie sous forme de tétrahydrodérivés sulfoconjugués provenant d'un métabolisme direct du sulfate de corticostérone (80) et en faible quantité dans des tétrahydrodérivés glucuroconjugués provenant d'un métabolisme indirect du sulfate de corticostérone, après hydrolyse de la copule sulfate (80, et Lebeau, DEA Orsay). Après une injection intraveineuse de sulfate-S³⁵ de corticostérone-H³ à un homme jeune et normal, le taux de production du sulfate, calculé d'après l'activité spécifique du sulfate de corticostérone urinaire, acétylé par de l'anhydride acétique radioactif, était de 5,3 mg/j. Après une injection de corticostérone tritiée au même homme quelques semaines plus tard, les activités spécifiques mesurées dans les métabolites urinaires glucuroconjugués de la corticostérone, étaient beaucoup plus élevées que celles des métabolites sulfoconjugués de l'hormone, suggérant que les sulfates urinaires avaient subi une "dilution" par un composé endogène. Le précurseur le plus logique semblait être du sulfate de corticostérone sécrété par la surrénale, bien que d'autres explications soient également possibles (sulfate de 11-desoxycorticostérone, en équilibre avec la forme 11-hydroxylée dans l'organisme, ou bien un analogue 3 β -hydroxy- Δ 5 de la corticostérone).

D'autres chercheurs, depuis, se sont intéressés au problème de la production de ce sulfate de corticostérone (54, 81) et s'ils ont trouvé des taux de production variables (de 200 à 800 $\mu\text{g}/24\text{ h}$), leurs valeurs demeurent très inférieures à celles trouvées dans notre laboratoire. Pour expliquer ces différences, on peut invoquer soit des erreurs techniques, peu vraisemblable car le dosage par l'anhydride acétique marqué est une méthode spécifique et sûre, soit des différences importantes de taux de production chez les sujets d'expérience, ce qui se produit en effet pour le sulfate de déhydroépiandrosterone. Les résultats de Giroud et coll. (54) tendent à confirmer l'hypothèse d'une sécrétion, et l'importante formation de sulfate de corticostérone dans des coupes de surrénale de nouveau-né (56,57) et des homogénats de surrénale foetale (116) semblent prouver que ce composé joue un rôle à la naissance.

La preuve indirecte d'une sécrétion étant insuffisante, le sulfate de corticostérone a été isolé dans l'urine, le tissu surrénalien et le plasma, dans l'idée que les concentrations déterminées permettraient de confirmer l'hypothèse d'une sécrétion.

1° - Sulfate de corticostérone dans l'urine

Des expériences préliminaires avaient semblé démontrer que le taux urinaire de sulfate de corticostérone était très différent chez l'homme et chez la femme. Après solvolysé des urines préalablement débarrassées des stéroïdes libres, puis chromatographie sur florisil et plusieurs fois sur célite et sur papier, (où la radioactivité correspondait à l'absorption dans l'ultra-violet), la corticostérone provenant de la fraction solvolysée, avait été mesurée à 240 $\text{m}\mu$. Après acétylation, elle avait été chromatographiée sur célite et sur papier et mesurée de nouveau à 240 $\text{m}\mu$. On trouvait 440 et 500 $\mu\text{g}/24\text{h}$ chez deux hommes jeunes et normaux. Dans deux cas de femmes jeunes, les urines de 24 heures ont été extraites et purifiées de la même façon ; il n'y avait pas l'absorption à 240 $\text{m}\mu$ caractéristique de la corticostérone à l'endroit où migrait le traceur.

Il a été décidé de refaire ces dosages, en mesurant la quantité de sulfate de corticostérone par acétylation avec de l'anhydride acétique marqué.

a) Taux urinaire de sulfate de corticostérone chez un homme normal.

Le sulfate de corticostérone a été mesuré dans les urines de 24 heures d'un homme normal de 38 ans.

Les urines sont incubées avec du sulfate de corticostérone- H^3 et de la corticostérone- C^{14} . La corticostérone libre est éliminée par 3 extractions (v/v) au dichlorométhane, et le sulfate extrait ensuite de la phase aqueuse par la méthode de McKenna. Le sulfate est purifié par chromatographie sur célite dans le système H, solvolysé, chromatographié sur célite dans le système B et sur papier dans le système 6 et acétylé par l'anhydride acétique- C^{14} . L'acétate de corticostérone doublement marqué est purifié sur célite dans le système D, puis recristallisé dans le mélange isooctane-acétate d'éthyle avec de l'acétate de corticostérone de référence (voir tableau II, chapitre II,B,3).

Recristallisations

	<u>activité spéci- fique</u> <u>p.r. à ^3H (cpm/μg)</u>	<u>activité spéci- fique</u> <u>p.r. à ^{14}C (cpm/μg)</u>	<u>cpm ^3H/cpm ^{14}C</u>
1) cristaux	7,67	0,47	16,3
eaux mères	15,57	0,51	30,4
2) cristaux	7,72	0,49	15,67
eaux mères	8,46	0,50	16,80
3) cristaux	7,54	0,49	15,54
eaux mères	8,14	0,52	15,58

Taux urinaire du sulfate de corticostérone calculé d'après la quantité de tritium et de carbone-14 présents dans les cristaux = 33 μg /24 h.

b) Taux urinaire de sulfate de corticostérone chez une femme normale.

Les urines de 24 heures d'une femme de 30 ans ont été traitées exactement comme celles de l'expérience (a).

Recristallisations

	<u>activité spéci- fique</u> <u>p.r. à ^3H (cpm/μg)</u>	<u>activité spéci- fique</u> <u>p.r. à ^{14}C (cpm/μg)</u>	<u>cpm^3H/cpm^{14}C</u>
1) cristaux	23,83	0,64	37,09
eaux mères	68,3	0,53	128,8
2) cristaux	25,6	0,66	39,1
eaux mères	25,8	0,64	40,7
3) cristaux	23,4	0,59	39,6
eaux mères	22,6	0,55	40,4

Résultat du dosage de sulfate de corticostérone dans l'urine d'une femme = 48 μg /24 h.

Conclusion :

Il ne paraît pas y avoir de différence entre les taux urinaires du sulfate de corticostérone chez l'homme et chez la femme. Ces taux sont comparables à ceux trouvés par Pasqualini (81) (25-90 μg /24 h), et sont loin des 500 μg trouvés antérieurement. Ceci fait penser que soit nos premiers dosages étaient faux (et alors un composé semblable à la corticostérone et à son acétate dans toutes leurs migrations chromatographiques, a décuplé l'absorption à 240 m μ), soit les taux urinaires de sulfate de corticostérone sont extrêmement variables d'une personne à l'autre.

2° - Sulfate de corticostérone dans le tissu surrénalien normal.

Le sulfate de corticostérone a été mesuré dans 28,6 g de tissu surrénalien normal prélevé à des malades hypertendus (Services des Professeurs Vaysse à l'hôpital Beaujon et Monsaingeon à l'hôpital Paul Brousse, Villejuif).

Le tissu a été homogénéisé et soumis à deux extractions successives, d'abord par le méthanol (contenant les stéroïdes radioactifs corticostérone et sulfate de corticostérone) puis par l'ammoniaque 2M (contenant également des traceurs). L'extraction alcaline s'est révélée inefficace car les traceurs ajoutés n'ont pas été extraits et le résidu obtenu après évaporation des solvants était lourdement chargé d'impuretés. Le dosage a donc été fait sur les stéroïdes de la phase méthanolique, comme cela a été décrit dans le paragraphe 1,a) et comme schématisé dans le tableau II.

Calculée à partir du rapport $\text{cpm } ^3\text{H}/\text{cpm } ^{14}\text{C}$ dans les cristaux après 3 recristallisations, la quantité de sulfate de corticostérone dans ce tissu surrénalien était de 0,75 $\mu\text{g/g}$ tissu frais, ce qui est du même ordre que la quantité de sulfate de déhydroépiandrostérone isolé par Baulieu (7) dans les tumeurs surrénales (0,5-4 $\mu\text{g/g}$). Si l'on considère la concentration du sulfate de corticostérone dans le sang périphérique ($\sim 0,15 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$), on constate qu'elle est beaucoup plus faible que dans la glande, ce qui indique soit une mise en réserve du composé circulant, soit une sécrétion par la surrénale.

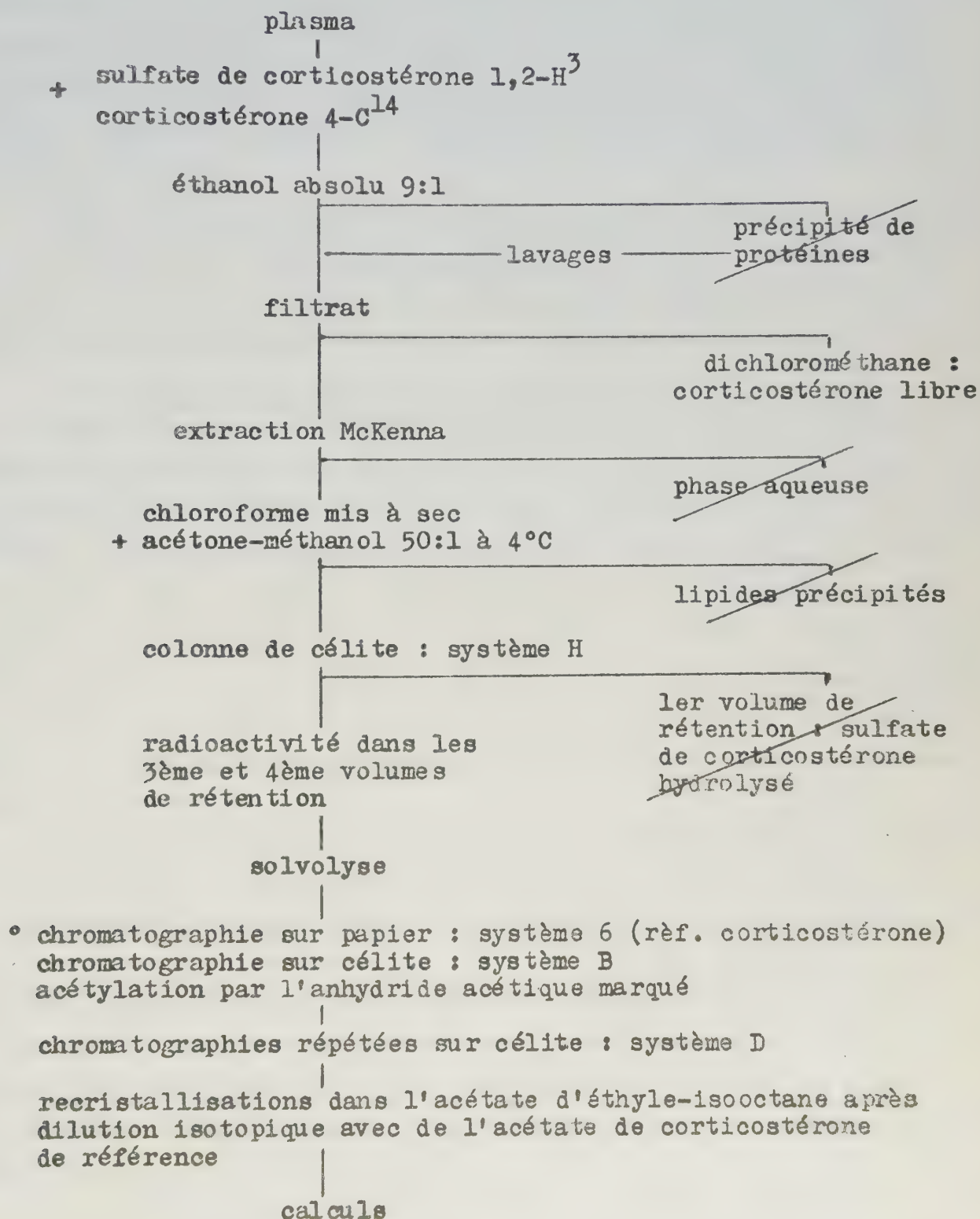
3° - Sulfate de corticostérone dans le plasma.

Le sulfate de corticostérone a été dosé dans un pool de 250 ml de plasma humain (tableau II).

Après une incubation d'une heure avec les stéroïdes radioactifs, les protéines sont précipitées par l'éthanol absolu et enlevées par filtration sur Buchner. Le sulfate de corticostérone est purifié

Tableau II

Dosage du sulfate de corticostérone dans le plasma



Le dosage à partir de cette étape est le même pour la corticostérone libre.

par les méthodes habituelles, et après solvolysé et contrôle chromatographique, est acétylé par l'anhydride acétique marqué. L'acétate de corticostérone doublement marqué est abondamment purifié par chromatographie (fig. 4) et recristallisation, et la quantité de sulfate de corticostérone présent dans l'échantillon initial calculée à partir de la radioactivité présente dans les derniers cristaux.

Pour 250 ml de plasma, nous avons trouvé 0,366 μg de sulfate de corticostérone, soit 0,146 $\mu\text{g}/100$ ml de plasma, c'est-à-dire environ dix fois moins que de corticostérone libre (82). C'est aussi la valeur moyenne trouvée par Giroud et coll. (105).

4° - Demi-vie du sulfate de corticostérone dans le sang.

Comme le sulfate de déhydroépiandrostérone est éliminé du sang lentement (il a une demi-vie de 6-8 heures) (10,95), nous pensions qu'il pouvait en être de même pour le sulfate de corticostérone. Nous avons injecté du sulfate de corticostérone tritié à une femme jeune, normale, et la quantité de radioactivité due au traceur a été mesurée dans le plasma après 1/2 heure, 1 heure, puis toutes les 2 heures pendant 12 heures. Après 4 heures on ne retrouvait plus que 0,006 % de la dose injectée (par 100 ml de plasma) donc les résultats devenant extrêmement imprécis, nous n'en avons pas tenu compte.

Lorsqu'on représente le $\log \text{cpm } ^3\text{H}/100 \text{ ml}$ de plasma en fonction du temps, la meilleure droite calculée à partir des points expérimentaux valables (fig. 5) a une pente de $-0,0058 (\pm 0,00167)$ et une ordonnée à l'origine de $4,306 (\pm 0,0938)$. La demi-vie du sulfate de corticostérone est donc de $\frac{\log 2}{0,0058} = 52 \text{ min}$, du même ordre que la demi-vie de la corticostérone libre (82). Giroud et coll. (54) ont également trouvé une demi-vie de 45-50 min. pour le sulfate de corticostérone, alors nous n'avons pas répété cette expérience.

Figure 4

Purification de l'acétate de corticostérone.

Chromatographie sur célite dans le système D.
La dernière colonne se fait en présence d'acétate de
corticostérone de référence, que l'on peut mesurer
à 240 mμ.

— ^3H TRACEUR

--- ^{14}C ACETATE

..... D.O. 240m μ Ac. B

A

CPM

B

C

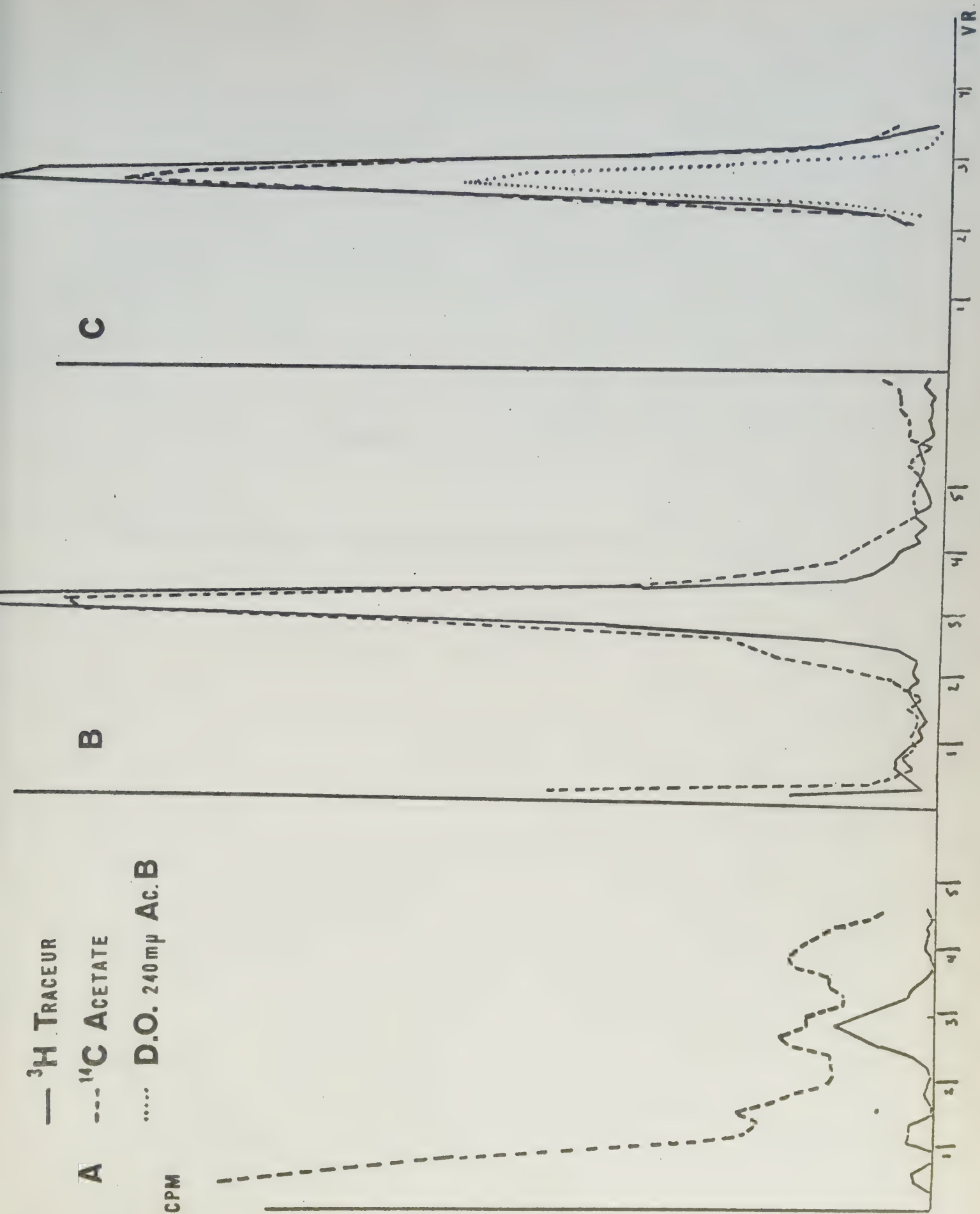


Figure 5

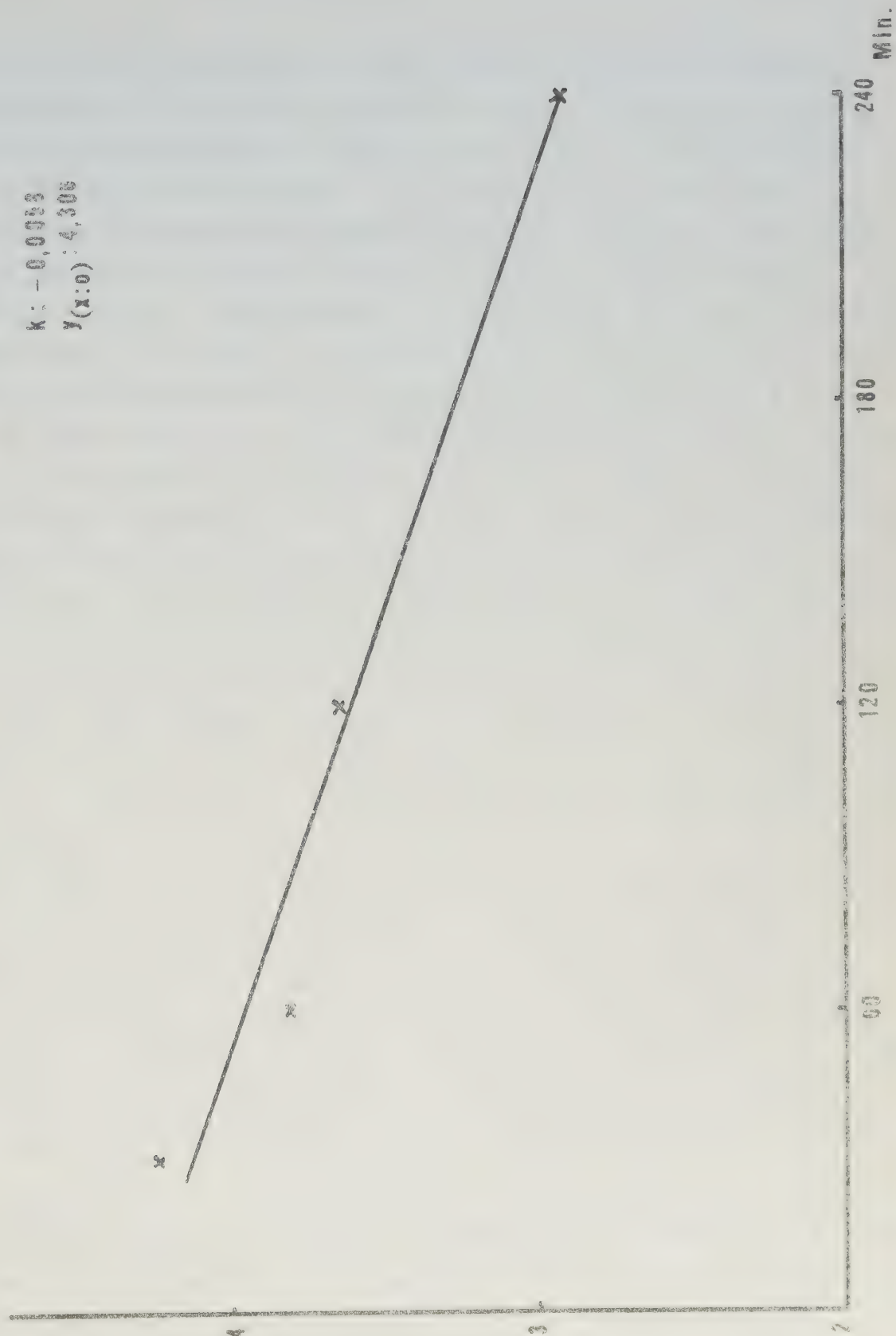
Disparition du sulfate de corticostérone dans le plasma.

Log CPM ^3H / 100 ml plasma

$t_{1/2}$: 52 min.

k : -0.0083

$y(x:0)$: 4.306



Contrairement à ce qui se passe pour le sulfate de déhydroépiandrostérone, il apparaît que dans ce cas, la sulfoconjugaison du stéroïde n'empêche pas sa transformation par les enzymes hépatiques et sa rapide élimination. La protection observée dans le cas du sulfate de déhydroépiandrostérone, et qui paraît liée à la sulfoconjugaison du stéroïde puisque la déhydroépiandrostérone libre a une demi-vie de 0,4 heure, ne semble pas intervenir pour la corticostérone, et le taux d'élimination des stéroïdes dans l'organisme est probablement dû à un phénomène plus complexe, lié aux volumes de distribution de ces stéroïdes et à leurs liaisons spécifiques et non spécifiques aux protéines plasmatiques. Bulbrook et coll. (111) ont également trouvé que chez les mammifères d'espèces différentes (Homme, Rat, Lapin) les demi-vies des stéroïdes sulfoconjugués sont très variables et pensent que cela est dû à des différences dans leur liaison aux protéines plasmatiques.

En admettant que le sulfate de corticostérone est distribué dans un seul compartiment métabolique, l'ordonnée à l'origine (exprimée en cpm/100 ml de plasma) de la droite de régression décrivant la disparition du stéroïde dans le sang est égale à :

$100/\text{volume de distribution (100 ml)}$

Comme $\text{MCR} = kV$ et $\text{PR} = \text{MCR} \times \text{concentration plasmatique}$ (44), (MCR : taux d'épuration métabolique, k : pente de la droite, V : volume de distribution (litres), PR : taux de production) on trouve que le taux de production du sulfate de corticostérone est de 1,4 mg/24 h, résultat plus fort que celui de Giroud et coll. (54) et de Pasqualini (81) qui trouvent de 200-800 $\mu\text{g}/24 \text{ h}$, mais sensiblement plus faible que nos résultats précédents de 5 mg/24 h (61).

Conclusion

On pensait que s'il existait un mécanisme contrôlant le niveau d'hormone libre (et active) circulante par la sulfoconjugaison (et l'inactivation), le sulfate de corticostérone pouvait être le "régulateur" dans la série des hormones glucocorticoïdes, comme le

sulfate de déhydroépiandrostérone pouvait être celui des hormones androgènes.

Lors de premières expériences, le taux de production élevé du sulfate de corticostérone mesuré à partir de ses métabolites urinaires semblait confirmer cette hypothèse, mais des recherches directes dans le sang et les tissus n'ont pas permis de mettre en évidence les quantités de sulfate de corticostérone auxquelles on s'attendait. Comme le sulfate de corticostérone est rapidement éliminé du sang, cela permet d'expliquer qu'il y ait à la fois un taux de production relativement élevé et une concentration sanguine faible. Cela démontre aussi que le sulfate de corticostérone n'a pas le destin privilégié du sulfate de déhydroépiandrostérone qui est éliminé du sang très lentement, et que la sulfoconjugaison d'un stéroïde ne suffit pas à expliquer ce phénomène. Chez l'homme adulte, enfin, le sulfate de corticostérone circule en quantités probablement trop faibles pour exercer un contrôle effectif sur le taux de corticostérone libre, mais ce mode de régulation est possible, et peut fonctionner chez le fœtus (116) et le nouveau-né (57), ou dans des cas pathologiques. Un exemple de ce type de régulation est apporté par les récents travaux de Giroud et coll. (105) ; chez l'enfant à la naissance, la concentration de sulfates de corticostérone et de 11-desoxycorticostérone dans le cordon ombilical (et provenant de la circulation fœtale) est aussi élevée que celle du cortisol, alors que chez la mère ces deux stéroïdes sulfoconjugués circulent en faible quantité. Les auteurs suggèrent que chez le fœtus, la formation de ces sulfates dans la surrénale ou le foie pourrait bloquer la biosynthèse de l'aldostérone et contrôler l'action minéralocorticoïde de la 11-desoxycorticostérone formée à partir de la progestérone maternelle.

Chez l'homme adulte, la sécrétion de sulfate de corticostérone pourrait être un reliquat d'un phénomène qui a eu son importance avant et au moment de la naissance.

C - Sulfate de corticostérone dans les surrénales et le plasma du Rat à la naissance.

Chez le fœtus du Rat, on constate une augmentation rapide du poids de la surrénale à partir du 18ème jour de la gestation, suivie d'un ralentissement à la veille de la naissance qui a lieu le 21ème jour. Accompagnant cette hausse de poids, mais plus frappant encore, le taux de corticostérone surrénalien augmente rapidement du 17ème au 18ème jour, atteignant un maximum qui peut égaler celui d'un rat normal adulte soumis à l'agression, et s'effondre avant la naissance (52). Jost (50) a noté que cette phase d'intense activité surrénalienne correspondait à une nette augmentation de la mise en réserve du glycogène dans le foie du fœtus, et s'est demandé si cela était dû à une sensibilité accrue des enzymes hépatiques aux hormones corticosurrénales, ou si la baisse subite du taux surrénalien d'hormones corticostéroïdes observée après le 18ème jour était due à une sécrétion accrue de ces hormones, ou enfin si l'action sur le glycogène hépatique était le résultat d'un accroissement simultané des deux effets. Il s'est aussi posé la question : pourquoi ces changements subits au 18ème jour ? Cette phase critique de stimulation surrénalienne semble refléter une activité passagère de l'hypophyse, qui serait déclenchée par mécanisme de "feed back". M. Jost a pensé que si la corticostérone sécrétée à ce moment là l'était sous forme sulfoconjuguée, elle pourrait échapper à son rôle de répresseur de l'activité hypophysaire, et celle-ci déréprimée, stimulerait la surrénale etc...

Il a donc été décidé de mesurer le sulfate de corticostérone dans les surrénales et le plasma du Rat, avant et après sa naissance. Cela était d'autant plus intéressant que chez l'Homme, il semble

y avoir une intense activité sulfotransférase chez le fœtus (105) et le nouveau-né (56), affectant en particulier la corticostérone et la 11-desoxycorticostérone (56, 105) qui ne sont pas les corticostéroïdes les plus importants. A fortiori, chez le Rat dont l'hormone glucocorticoïde principale est la corticostérone, l'existence du dérivé sulfoconjugué paraissait probable, et son rôle physiologique intéressant à découvrir.

a) Sulfate de corticostérone dans les surrénales du fœtus de Rat.

La quantité de sulfate de corticostérone et de corticostérone libre présente dans 76 paires de surrénales de fœtus de rats au 19ème jour de la gestation a été mesurée comme dans les expériences précédentes (chapitre II, B, 2 et 3). Ces surrénales contenaient 5,4 µg de corticostérone pour 76 paires de surrénales, soit 0,07 µg/paire, mais pas de sulfate de corticostérone (Tableau III).

b) Sulfate de corticostérone dans les surrénales et le plasma du Rat nouveau-né.

La corticostérone et son sulfate ont été dosés dans 1) 15,5 ml de plasma et 180 surrénales et 2) 27 ml de plasma et 348 surrénales de rats Sherman de deux jours.

Nous avons trouvé (Tableau III) : dans le plasma 12 µg de corticostérone et 4-6 µg de sulfate de corticostérone pour 100 ml, et dans les surrénales, 0,034 µg/paire de surrénales de corticostérone mais pas de sulfate.

Conclusion

Le sulfate de corticostérone a été mesuré dans le plasma et les surrénales du Rat, chez le fœtus de 19 jours et le nouveau-né. Le taux de corticostérone dans ces tissus a été mesuré parallèlement, comme contrôle de la méthode.

Tableau III

Corticostérone et sulfate de corticostérone chez le rat à la naissance.

	<u>foetus 19ème jour</u>		<u>naissance</u>	
	<u>plasma</u> µg/100 ml	<u>surrénales</u> µg/paire	<u>plasma</u> µg/100 ml	<u>surrénales</u> µg/paire
Corticostérone		0,070 (0,065) (52)	11,6 (9-15) (42)	0,034 (0,033) (52)
Sulfate de corticostérone		0	4,4 6,0	0

Entre parenthèses figurent les valeurs de la littérature.

La quantité de sulfate de corticostérone dans le plasma représente environ le tiers de la quantité de corticostérone libre, mais il ne semble pas y avoir de sulfate de corticostérone dans le tissu surrénalien. Il est donc probable que le sulfate circulant vienne du foie, et qu'il n'y a pas de sulfate de corticostérone sécrété par la surrénale chez le Rat, du moins chez le foetus et à la naissance. Les taux de corticostérone libre plasmatique et surrénalienne correspondent aux valeurs de la littérature.

C H A P I T R E .III.

SULFATES DE STEROIDES ET BIOSYNTHESE SURRENALIENNE DES HORMONES

CHEZ L'HOMME.

Après la démonstration de la sulfoconjugaison des stéroïdes dans la surrénale, et la mise en évidence de certains de ces sulfates dans le tissu surrénalien et le sang, il restait à décrire leur métabolisme et à comparer la voie de biosynthèse des stéroïdes sulfoconjugués à celle des hormones libres.

Certains travaux avaient déjà été entrepris dans notre et d'autres laboratoires pour découvrir cette "voie des sulfates" dont on espérait démontrer l'importance quantitative. On pouvait imaginer l'existence de toute une série de "pré-hormones", sulfoconjuguées, inactives (10, 47), maintenues en réserve dans certains tissus, et qui, par simple coupure du sulfate, pouvaient être transformées en hormone active, constituant ainsi une régulation du taux hormonal circulant. Baulieu (8) avait démontré la transformation "directe" in vivo du sulfate d'androstène 3 β ,17 β -diol en sulfate de déhydroépiandrostérone, sans hydrolyse intermédiaire du sulfate, et Calvin, Van de Wiele et Lieberman (18,19) avaient décrit la conversion directe du sulfate-S³⁵ de prégnénolone-H³ en sulfate de 17-hydroxyprégnénolone doublement marqué. La 17-hydroxyprégnénolone est un carrefour dans la voie de biosynthèse des hormones libres puisque sous l'action de desmolases surrénaliennes elle peut donner des androgènes à 19 carbones (107) et que des hydroxylases et isomérases de surrénales normales et tumorales (73,112) la transforment en cortisol. Il était donc intéressant d'étudier le métabolisme de son sulfate. Un an plus tard Wieland et coll. ont

mis en évidence le sulfate de 17-hydroxyprégnénolone dans le sang veineux surrénalien (en plus grande quantité que dans le sang veineux périphérique) confirmant l'importance de ce composé dans le métabolisme surrénalien (121).

A - Métabolisme in vitro de la 17-hydroxyprégnénolone et de son sulfate dans du tissu tumoral surrénalien (62).

Du sulfate de 17-hydroxyprégnénolone et de la 17-hydroxyprégnénolone libre ont été incubés simultanément ; du sulfate de déhydroépiandrostérone et de la déhydroépiandrostérone libre dans une incubation témoin ont permis d'évaluer l'interconversion déhydroépiandrostérone $\rightleftharpoons$ sulfate de déhydroépiandrostérone (90).

1° - Incubation

Le tissu incubé provenait d'une tumeur virilisante de la surrénale prélevée à une femme de 60 ans ; avant l'opération cette femme avait une excrétion urinaire d'environ 20 mg/24 heures de 17-oxostéroïdes et 10 mg/24 heures de 17-hydroxycorticoïdes. Les conditions d'incubation sont celles de Weliky et Engel (112), légèrement modifiées.

Milieu d'incubation :

0,9 %	NaCl	(0,154 M)	940 ml	pH 7,4
1,15 %	KCl	(0,154 M)	40 ml	
1,22 %	CaCl ₂	(0,11 M)	30 ml	
2,11 %	KH ₂ PO ₄	(0,154 M)	10 ml	
3,82 %	MgSO ₄	(0,154 M)	10 ml	
	Na ₂ HPO ₄	(0,1 M)	130 ml	
1,3 %	NaHCO ₃	(0,154 M)	140 ml	

Substrats radioactifs :

3 incubations ont été faites simultanément avec les traceurs suivants :

- 1) Sulfate-S³⁵ de 17-hydroxypregnénolone-7 α -H³ (biosynthétisé dans notre laboratoire, activité spécifique :

$$\left. \begin{array}{l} \text{H}^3 \text{ 15 mC}/\mu\text{M} \\ \text{S}^{35} \text{ 1,2 mC}/\mu\text{M} \end{array} \right\} : 0,07 \mu\text{g}$$

- 2) 17-hydroxypregnénolone-H³ (activité spécifique 15 mC/ μ M) :
0,014 μ g

- 3) Sulfate de déhydroépiandrostérone-7 α -H³ (activité spécifique 1,7 mC/ μ M) : 0,2 μ g

Déhydroépiandrostérone 4-C¹⁴ (activité spécifique 0,05mC/ μ M)
0,9 μ g

Tous les traceurs ont été vérifiés avant l'incubation par chromatographie sur colonne et sur papier.

3 à 9 g de tranches de tissu coupées à la lame de rasoir ont été incubées avec les substrats radioactifs dans 50 ml de tampon contenant 100 mg de glucose et 15-50 Unités Internationales d'ACTH. Les incubations ont été faites dans un incubateur Dubnoff à 37° dans une atmosphère Oxygène 93 % - anhydride carbonique 7 %. Après 3 heures et demie les réactions ont été arrêtées par l'adjonction de 10 ml d'alcool dans le milieu, et les récipients mis à -20° C.

2° - Extraction

20 ml d'alcool ont été ajoutés aux échantillons incubés pour précipiter les protéines, et le précipité filtré et lavé par 3 fois 20 ml d'acétone-éthanol 1:1 tiède. Le filtrat a été mis à sec, le résidu repris dans 50 ml et extrait 3 fois par le dichloro-méthane comme décrit précédemment, puis les phases aqueuse et

organique ont été mises à sec par évaporation sous vide. Des aliquotes des 2 phases de chaque incubation ont été comptées et ont permis de déterminer les pourcentages de transformation des stéroïdes incubés. Dans les cas où cela était possible, de la déhydroépiandrostérone- C^{14} a été ajoutée avant l'extraction pour évaluer les pertes expérimentales.

3° Purification et identification

a) Phase aqueuse

L'extrait sec a été chromatographié sur colonne de célite dans le système H. La radioactivité était éluée dans plusieurs pics, mal séparés les uns des autres.

Sulfate de déhydroépiandrostérone : La radioactivité éluée dans un des pics de la colonne de célite, chromatographiée sur papier dans le système 9 migrerait comme le sulfate de déhydroépiandrostérone de référence. Cette fraction a donc été réduite par le borohydrure de sodium (Techniques A 7), et solvolysée, puis chromatographiée sur papier dans le système 5. La zone radioactive correspondait au 3β 17β -dihydroxy-androsta-5-ène (Δ^5 -androstènediol) de référence, qui est bien le produit d'une réduction de la déhydroépiandrostérone par le borohydrure.

Sulfate de 17-hydroxyprégnénolone : Une partie de la radioactivité éluée de la colonne de célite dans le système H migrerait comme le sulfate de 17-hydroxyprégnénolone en chromatographie sur papier dans le système 9. Cette fraction a été traitée par le borohydrure de sodium et solvolysée ; en chromatographie sur papier dans le système 5 elle migrerait comme le 3β 17β 20β -trihydroxypregn-5-ène (20β prégnénetriol) produit de réduction de la 17-hydroxyprégnénolone.

b) Phase dichlorométhane

L'extrait sec a été chromatographié sur célite dans le système G.

Déhydroépiandrostérone : Les tubes du pic migrant comme la déhydroépiandrostérone dans ce système ont été réunis et traités par le borohydrure de sodium. Chromatographié ensuite dans le système 5, ce composé migrerait, comme le Δ^5 -androstènediol, indiquant qu'à l'origine il s'agissait de déhydroépiandrostérone.

17-hydroxyprégnénolone : La fraction radioactive migrant comme la 17-hydroxypregnenolone dans le système G a été traitée par le borohydrure de sodium et chromatographiée sur papier dans le système 5. La zone radioactive migrant comme le 20 β prégnénetriol de référence, provenait de la 17 hydroxyprégnénolone.

Les résultats, exprimés en pourcentages des cpm récupérés dans les stéroïdes isolés et purifiés, figurent au tableau IV.

4° - Conclusions

En regardant le tableau IV on peut conclure que :

a) le sulfate de 17-hydroxyprégnénolone est peu hydrolysé dans ces conditions, malgré la présence de sulfatases microsomiales dans le milieu, puisqu'on retrouve moins de 3 % du composé libre après incubation du sulfate. Ceci peut s'expliquer par une inhibition des sulfatases par le tampon phosphate d'incubation (17), mais Killinger et Solomon (55) ont également trouvé 63 % du produit initial inchangé après incubation de sulfate de prégnénolone avec des homogénats de surrénale dans du tampon bicarbonate.

Tableau IV

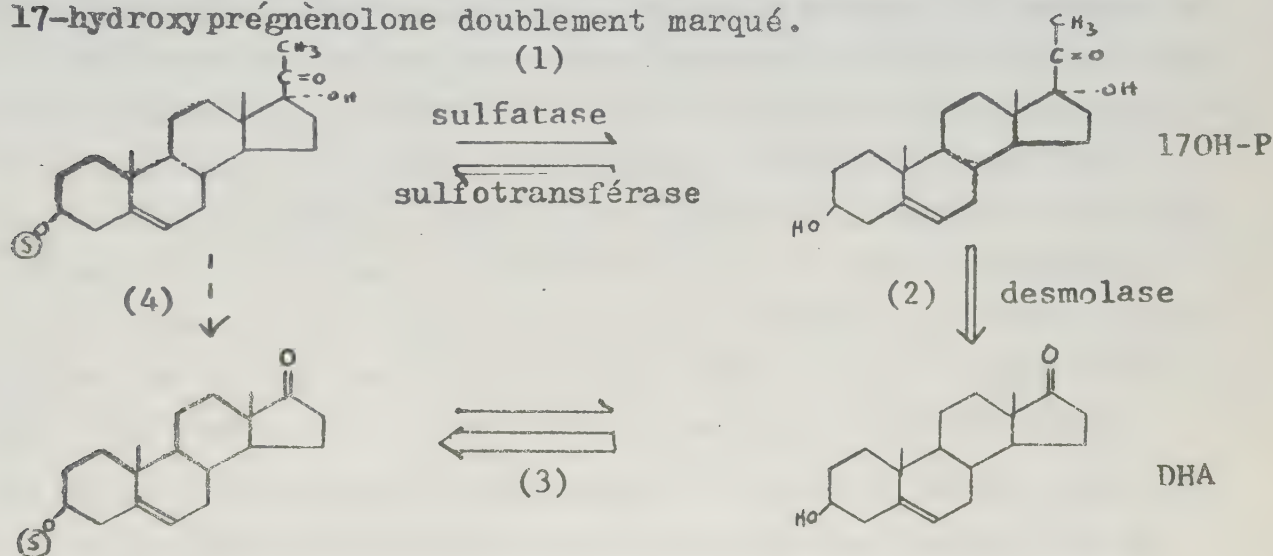
Métabolisme in vitro de la 17-hydroxypregnénolone, de la déhydroépiandrosterone et de leurs sulfates

cpm récupérés dans les stéroïdes isolés x 100

cpm extraits

<u>composés incubés</u>	<u>composés isolés</u>			
	<u>DHA</u>	<u>DHA-Sulfate</u>	<u>17OH-P</u>	<u>17OH-P-Sulfate</u>
H^3	0,1	5	< 3	15
S^{35}	—	3	—	15
17OH-P- H^3 sulfate- S^{35}				
17OH-P- H^3	10	50	30	10
[Sulfate de DHA- H^3 DHA- C^{14}]	H^3 15	70		
	C^{14} 30	60		

b) le sulfate de 17-hydroxyprégnénolone ne donne naissance qu'à très peu de déhydroépiandrostérone libre, mais il se peut que dans ces conditions d'incubation la déhydroépiandrostérone soit sulfoconjuguée dès sa formation. L'élévation du rapport H^3/S^{35} dans le sulfate de déhydroépiandrostérone isolé indique qu'une partie du sulfate- S^{35} de 17-hydroxyprégnénolone- H^3 incubé a été hydrolysée après sa transformation en déhydroépiandrostérone, et que celle-ci a été resulfatée ensuite. L'existence de sulfate de déhydroépiandrostérone doublement marqué démontre dans cette expérience une transformation "directe" à partir de sulfate de 17-hydroxyprégnénolone doublement marqué.



c) du sulfate de 17-hydroxyprégnénolone est formé à partir du composé libre, mais la formation de sulfate de déhydroépiandrostérone (réactions 2 et 3) est davantage favorisée que la réaction 1 dans cette expérience. Cohn, Mulrow et Dunne (25) ont incubé de la 17-hydroxyprégnénolone avec des coupes de tumeur surrénalienne et ont trouvé 13 % de sulfate de déhydroépiandrostérone et 0,8 % de déhydroépiandrostérone libre, ce qui va dans le même sens que nos résultats.

d) du sulfate de déhydroépiandrostérone est formé à partir du composé libre et il y a également une hydrolyse de ce sulfate.

e) la 17-hydroxyprégnénolone libre paraît être un meilleur précurseur du sulfate de déhydroépiandrostérone que ne l'est le sulfate de 17-hydroxyprégnénolone.

Alors que la tendance générale, en 1964, était de considérer que la voie de biosynthèse des sulfates était au moins aussi importante que celle des hormones libres, ces résultats venaient s'inscrire contre cette hypothèse. On a critiqué à juste titre que nous n'avions pas tenu compte, dans cette expérience, des précurseurs endogènes, et que les pourcentages de conversion de la 17-hydroxyprégnénolone et de son sulfate n'étaient pas comparables puisqu'on ne connaissait pas l'activité spécifique réelle des précurseurs ; il semble cependant que dans nos conditions d'expérience et avec la très faible quantité de traceurs incubés, la capacité des enzymes ne constituait pas une étape limitante. Il a été démontré au cours des années suivantes que la voie de biosynthèse des stéroïdes libres est nettement la plus importante quantitativement, et que la sulfoconjugaison a lieu *in fine*.

f) En plus des réactions d'hydrolyse, on démontre ici que le sulfate de 17-hydroxyprégnénolone peut être métabolisé par des enzymes surrénaliens. Des desmolases et 17 β -ol deshydrogénases le transforment en sulfate de déhydroépiandrostérone, sans qu'il y ait coupure du sulfate, et d'autre part, si l'on retrouve bien en fin d'incubation toute la radioactivité provenant de la 17-hydroxyprégnénolone libre, on ne retrouve que très peu de celle venant du sulfate de 17-hydroxyprégnénolone. Après incubation de ce dernier, la phase organique contenait une série de composés non identifiés et 0,9 % de cortisol-H³. Du tritium a aussi été retrouvé dans une fraction polaire après chromatographie de la phase aqueuse.

Cette fraction a été hydrolysée puis chromatographiée sur papier dans les systèmes 1 et 7 : les composés libres étaient plus polaires que le cortisol, et migraient entre la tétrahydrocorticos-térone et la 3β 11 β 17 α 21-tétrahydroxy-pregna-5-ène-20-one. La faible quantité de radioactivité isolée n'a pas permis de poursuivre cette identification.

Le fait qu'on ne retrouve pas de cortisol dans l'incubation de 17-hydroxypregnenolone libre paraît surprenant si l'on pense que dans les mêmes conditions Weliky et Engel observaient une conversion de 63 % (112). Seulement il s'agissait dans leur expérience d'une tumeur corticosurrénalienne de type Cushing, qui sécrétait beaucoup de cortisol, alors que dans notre expérience, le tissu incubé provenait d'une tumeur virilisante de la surrénale, sécrétant probablement surtout du sulfate de déhydroépiandrostérone.

Les réactions 2 et 3 étant nettement favorisées dans nos conditions d'expérience, il apparaît que si le sulfate de 17-hydroxy pregnenolone n'est pas hydrolysé par une sulfatase (réaction 1), il est disponible pour subir d'autres modifications, et peut être transformé en d'autres composés que le sulfate de déhydroépiandrostérone.

Il semble donc que dans cette série d'incubations, les sulfates de stéroïdes aient subi un métabolisme différent des stéroïdes libres, et que même si la "voie des sulfates" est moins importante quantitativement que la voie des hormones libres, elle pourrait permettre la biosynthèse de composés différents.

B - Métabolisme du sulfate de cholestérol

Le cholestérol étant le précurseur commun des stéroïdes surrénaliens (14,31,51,58,68,117), on pouvait penser que son sulfate serait à l'origine de la voie de biosynthèse des stéroïdes 3β -hydroxy Δ_5 sulfoconjugués. S'opposant à cette idée, il y avait nos résultats négatifs dans des essais de sulfoconjugaison du cholestérol par du surnageant de tumeur surrénalienne (chapitre I), ceux de Schneider et Lewbart (104) et ceux de Nose et Lipmann (77), qui ont isolé une sulfotransférase de foie de lapin capable d'agir sur la déhydroépiandrostérone, la prégénolone, la testostérone et d'autres stéroïdes, mais pas sur le cholestérol. Cependant, Roberts et coll. (91) venaient de trouver que chez une femme porteuse d'une tumeur surrénalienne, après injection de sulfate- S^{35} de cholestérol- H^3 dans l'artère splénique alimentant la tumeur, les urines contenaient 0,5 % de sulfate- S^{35} de déhydroépiandrostérone- H^3 , marqué dans le même rapport H^3/S^{35} que le produit injecté. D'autre part, la preuve était faite que le sulfate de cholestérol est un produit naturel dans l'organisme, puisque Drayer et coll. (32) en ont isolé 1,5 mg à partir d'1 kg de surrénale de boeuf. Plus récemment, et dans d'autres laboratoires, on a isolé du sulfate de cholestérol chez l'Homme dans de nombreux tissus (34,71,87,122), et observé sa formation (4, 123) et son métabolisme in vitro (86,92,124). Il s'est avéré que pour obtenir un métabolisme du sulfate de cholestérol in vitro, il fallait opérer dans des conditions où la perméabilité des cellules ou des organelles n'intervenait pas. Raggatt et Whitehouse (86) ont obtenu la transformation du sulfate de cholestérol en sulfate de prégénolone avec des préparations acétoniques de mitochondries isolées de cortex surrénalien de boeuf, et Roberts et coll. (92) et Young et Hall (124) ont observé la même réaction avec des mitochondries soniquées.

Ceci pourrait expliquer l'échec de nos essais de transformation du sulfate de cholestérol in vitro par des cellules entières.

1° - Métabolisme in vitro du cholestérol et du sulfate de cholestérol dans du tissu tumoral testiculaire.

Cette expérience avait pour but d'étudier simultanément le métabolisme du cholestérol et de son sulfate. Elle a été tentée malgré les résultats négatifs de Savard, Dorfman et coll. (98), qui n'avaient retrouvé qu'une très faible quantité de radioactivité dans des métabolites très polaires, après avoir incubé du cholestérol- C^{14} avec du tissu de tumeur interstitielle du testicule. La technique suivie a été décrite par Gual, Dorfman et coll. (41); ils avaient observé la biosynthèse d'androgènes après incubation de $\Delta 5$ -pregnénolone avec du tissu tumoral interstitiel de testicule.

a) Traceurs

$1,5 \cdot 10^6$ cpm de sulfate de cholestérol- H^3 synthétisé dans notre laboratoire (activité spécifique 22 $\mu C/\mu M$) correspondant à 50 μg , et 300,000 cpm de cholestérol- C^{14} (activité spécifique 0,13 $\mu C/\mu M$) correspondant à 890 μg , dans un rapport cpm H^3 /cpm C^{14} de 4,9, ont été incubés.

b) Incubation

Le tampon employé était du Ringer-phosphate-bicarbonate pH 7,4 (voir chapitre III,A,1), auquel on a ajouté 0,085 g/ml (0,25 M) de saccharose. 2 g de tissu provenant d'une tumeur interstitielle du testicule ont été coupés au microtome et incubés dans des erlenmeyers qui contenaient les stérols marqués, en solution dans 20 ml de tampon. 500 Unités Internationales d'ACTH, 4,19 mg de NAD et 4,08 mg de NADPH ont été ajoutés au milieu d'incubation.

L'incubation a été faite à 37° C dans un incubateur Dubnoff, et dans une atmosphère d'oxygène 95 % - anhydride carbonique 5 %, et les réactions ont été arrêtées après 3 heures par l'adjonction de 30 ml d'éthanol. Le précipité de protéines a été filtré, le filtrat partagé entre l'eau et le dichlorométhane, comme décrit plus haut et les 2 phases mises à sec. Le partage est moins absolu pour les stérols que pour les stéroïdes, et les chromatographies ultérieures ont montré un certain passage de cholestérol dans la phase aqueuse et de sulfate de cholestérol dans la phase organique. Les extraits provenant de la phase aqueuse et du dichlorométhane ont été chromatographiés sur colonne de célite et sur papier (tableau V), et malheureusement les résultats ont été décevants.

c) Résultats

Phase aqueuse : Lors de la chromatographie sur colonne des composés hydrosolubles dans le système H, les sulfates d'androgènes devaient être élués dans le 2ème-3ème volume de rétention, or dans ce cas toute la radioactivité est apparue dans le premier volume de rétention, ce qui indiquait qu'il n'y avait pas eu de synthèse des stéroïdes sulfoconjugués. Ce résultat ressemble à ceux de Dixon, Vincent et Kase (30) qui ont obtenu moins de 1 % de sulfoconjugaison dans des incubations d'androgènes avec du tissu testiculaire normal.

La fraction éluee en début de colonne a été chromatographiée sur papier dans plusieurs systèmes de solvants pour voir si elle contenait des stéroïdes libres qui auraient été extraits par l'eau : elle contenait en effet un composé très polaire non identifié et un composé marqué par le C¹⁴ surtout, qui migrerait comme la Δ^5 -pregnenénone dans le système 3.

Tableau V

Etape de purification		Conversion		R°
		% des cpm incubés		
		H ³	C ¹⁴	
extraction	H ₂ O	69	56	1,2
	CH ₂ Cl ₂	1	25	0,04
H ₂ O (sulfates)		% des cpm extraits		
		H ³	C ¹⁴	
colonne de célite	radioactivité dans :			
système H	tube 1	9,3	37,8	0,2
(migration du S-chol)	tubes 2-10	99	36,6	2,3
.....				
tube 1 : chromatographié sur papier :	cm 1-3	0,3	0,2	1
système 9				
(référence S-chol)	cm 9-17	6,5	-	
(référence chol)	cm 25-28	0,9	29	0,03
.....				
région 25-28 cm :				
chromatographiée sur papier :	cm 1-5	0,03	3,2	0,008
système 3	(réf Δ5P)			
(référence chol)	cm 16-22	0,2	10,3	0,015

H ₂ Cl ₂ (stérols et stéroïdes libres)				
colonne de célite	tubes 1-9	-	25	
système A				
	lavages	0,5	0,8	0,56
.....				
lavages chromatographiés sur papier :	cm 9-17	0,24	0,1	2,1
système 9	(rèf S-chol)			
(référence chol)	cm 21-front	0,02	0,3	0,006

R = contribution de S-chol-H³/contribution de chol-C¹⁴.

Phase dichlorométhane : Dans une chromatographie sur célite dans le système A, toute la radioactivité a également été éluee dans le premier volume de rétention, alors que ce système de solvants élue normalement la $\Delta 5$ -prégnénolone dans le 3ème volume de rétention, puis la déhydroépiandrostérone dans le 4ème. Un composé radioactif plus polaire s'est révélé être du sulfate de cholestérol inchangé.

d) Conclusions

Outre les résultats négatifs déjà mentionnés, on voit dans le tableau V que la plus grande partie du Carbone 14 et du tritium est récupérée sous forme de cholestérol libre ou de sulfate de cholestérol non métabolisé. Les 0,1 % de C^{14} isolés au niveau du sulfate de cholestérol dans une chromatographie dans le système 9 laissent entrevoir une sulfoconjugaison possible, et il pourrait y en avoir davantage dans les 36 % de C^{14} élués dans la première chromatographie sur célite de la phase aqueuse. Cela est possible, car Young et Hall (123) obtiennent du sulfate de cholestérol- C^{14} après avoir incubé de l'acétate $1-C^{14}$ de sodium avec des tranches de testicule de lapin, mais le rendement de cette conversion est mille fois plus petit que celui de la transformation d'acétate en cholestérol libre.

Le tableau V montre encore que du tritium migre en chromatographie sur papier au niveau du cholestérol, ce qui indique qu'il y a hydrolyse du sulfate au cours de l'expérience. Ceci peut être dû à l'action des sulfatases puisqu'elles existent dans le tissu testiculaire (17), mais elles devraient être inhibées par le phosphate du milieu d'incubation, donc il y a probablement eu une hydrolyse chimique au cours de la purification. Les 0,03 % du tritium et 3 % du C^{14} retrouvés au niveau de la $\Delta 5$ -prégnénolone en chromatographie sur papier indiquent qu'il y a eu un léger

métabolisme du cholestérol libre et du sulfate de cholestérol, probablement après son hydrolyse puisqu'il n'y a pas trace de sulfate de $\Delta 5$ -prégnénolone

2° - Métabolisme in vitro du cholestérol et du stéarate de cholestérol dans du tissu tumoral surrénalien.

Après l'échec de l'expérience 1 nous avons pensé que ces résultats négatifs étaient peut être dûs à une mauvaise pénétration du cholestérol et de son sulfate dans les cellules, et qu'il faudrait refaire l'essai avec un ester du cholestérol et avec un tissu cible plus favorable, c'est-à-dire la surrénale. En effet, Riley (88) et Griffiths et coll. (39) avaient remarqué que la stimulation par l'ACTH ou le stress de surrénales humaines (suivie d'une biosynthèse accrue de stéroïdes) provoquait une baisse des stérols estérifiés dans la glande. Dailey, Swell et Treadwell (27) ont obtenu la synthèse de stéroïdes surrénaliens en incubant des esters d'acides gras du cholestérol avec des homogénats de surrénales de chien. Nous avons donc incubé simultanément du cholestérol $7\alpha\text{-H}^3$ et du stéarate de cholestérol 4-C^{14} avec des coupes de tumeurs surrénaliennes, comme dans l'expérience III,A. Deux autres incubations ont servi de témoins :

- a) de la $\Delta 5$ -prégnénolone- $16\alpha\text{-H}^3$ et du cholestérol 4-C^{14}
- b) les mêmes précurseurs, en présence d'un inhibiteur de la 17 hydroxylation, le SU 9055 de Ciba.

Ces témoins devaient démontrer la contribution relative des deux précurseurs aux métabolites formés et prouver que la voie de biosynthèse du cholestérol vers les corticostéroïdes et androgènes surrénaliens passe bien par la $\Delta 5$ -prégnénolone. L'emploi

de l'inhibiteur permettait de bloquer la réaction au niveau de la $\Delta 5$ -prégnénolone, provoquant une accumulation de la $\Delta 5$ -prégnénolone provenant du cholestérol, et empêchant la formation de 17-hydroxyprégnénolone et de déhydroisoandrosterone par cette voie.

a) Incubations

- 1) Cholestérol 7α - H^3 (120 $\mu C/mM$) : 3 μg
Stéarate de cholestérol $4-C^{14}$ (9 $\mu C/\mu M$) : 9 μg
- 2) $\Delta 5$ -prégnénolone $16-H^3$ (1,49 $mC/\mu M$) : 0,18 μg
Cholestérol $4-C^{14}$ (19,4 $\mu C/uM$) : 2,6 μg
- 3) $\Delta 5$ -prégnénolone 16α - H^3 }
Cholestérol $4-C^{14}$ } + 100 μg SU 9055

Ces précurseurs radioactifs ont été incubés avec des coupes de tumeur surrénalienne comme dans l'expérience III,A, et le même protocole a été suivi pour les extractions et les purifications.

1) Incubation de cholestérol-H³ et de stéarate de cholestérol-C¹⁴

Etape de purification		Conversion	
		<u>% des cpm incubés</u>	
extraction	H ₂ O	H ³	C ¹⁴
		54	7
	CH ₂ Cl ₂	68	13

H ₂ O (sulfates)		% des cpm extraits	
radioactivité dans :		H ³	C ¹⁴
a) colonne célite système H	tubes 1-15	47	47
.....	lavage	1	0,3
b) tubes 1-15 chromatographie sur papier système 9	toute la radio-activité se retrouve au front (stéroïdes libres)		
.....			
c) front de chromatographie	cm 0,6-7	4	-
b) chromatographié dans le système 3 (référence chol 26 cm)	cm 28	16	-
.....			
d) lavages colonne a) chromatographiés système 9	la radioactivité ne migre pas : 1 composé très polaire		

CH ₂ Cl ₂ (stéroïdes et stéroïdes libres)			
a) colonne célite système A	tubes 1-6	45	100
	8-22	5	-
.....	lavages	7	0,6
b) Tubes 1-6 de a) chromatographiés dans le système 9 (ref S-chol 12-17 cm) (stéroïdes libres)	cm 2-9	0,6	12
.....	cm 22 au front	25	10
c) Tubes 1-6 de a) chromatographiés dans le système 3 (référence chol 26cm)	cm 0-7	7	1
	cm 26-32	12	20

Résultats

a) Alors que la totalité du tritium provenant du cholestérol libre a pu être extraite du milieu d'incubation, 20% seulement du carbone ont été récupérés. Le stéarate de cholestérol a soit été adsorbé sur le verre du récipient en cours d'incubation, soit a pénétré dans les tissus de telle sorte que les procédés d'extraction utilisés étaient insuffisants pour le détacher.

b) La majeure partie de la radioactivité a été retrouvée dans des fractions très peu polaires, qui migraient en chromatographie sur papier comme le cholestérol.

c) Il n'y avait formation ni de sulfate de déhydroépiandrosterone ni de sulfate de prégnénolone à partir du cholestérol.

4 % du tritium de la phase aqueuse et 7 % du tritium de la phase organique ne migraient pas dans le système 3 mais il ne s'agissait probablement pas d'un stéroïde puisque sur colonne de célite dans le système employé pour chromatographier les stéroïdes libres, ce ou ces composés étaient élués dans les premiers tubes. Il s'agissait peut être de cholestérol hydroxylé en 20 ou 22 qui représente une des étapes intermédiaires dans la biosynthèse des stéroïdes à partir de cholestérol (21,103), mais ces composés n'ont jamais été isolés après incubation de cholestérol marqué (Lieberman, communication personnelle, 1968).

d) Une très faible partie du tritium de la phase aqueuse ne migrerait ni dans le système de chromatographie de partage spécifique des sulfates (H), ni dans le système 9. Ce composé, qui aurait pu être un sulfate très polaire, n'a pas été identifié.

d) Les faibles quantités de radioactivité récupérées après chromatographie sur papier ont empêché une identification plus précise des composés isolés.

2) Incubation de Δ^5 -pregnénolone- H^3 et cholestérol- C^{14}

Etape de purification		Conversion	
		<u>% des cpm incubés</u>	
		H^3	C^{14}
extraction	H_2O	59	72
	CH_2Cl_2	26	47

<u>H_2O (sulfates)</u>	radioactivité dans :	<u>% des cpm extraits</u>	
		H^3	C^{14}
colonne de célite système H	tubes 1-6	6	68
	7-11	26	0,07
	12-17	28	-
.....			
7-11 + 12-17 solvolysés	tubes 9-15	11	-
colonne de célite système A	(migration Δ^5 -P)		
	17-26	7	-
	(migration 17 OH-P + DHA)		

<u>CH_2Cl_2 (stéroïdes libres)</u>			
colonne de célite système A	tubes 1-6	1	31
	8-14	3	0,3
	(migration Δ^5 -P)		
	19-22	3,8	0,2
	(migration 17 OH-P + DHA)		

3) Incubation de Δ^5 -pregnénolone- H^3 et cholestérol- C^{14} + SU 9055

Etape de purification		Conversion	
		% des cpm incubés	
		H^3	C^{14}
extraction	H_2O	44	72
	CH_2Cl_2	32	36

<u>H_2O (sulfates)</u>	radioactivité dans :	<u>% des cpm extraits</u>	
		H^3	C^{14}
colonne de célite pour les sulfates de stéroïdes système H	tubes 1-4	9	71
	6-11	25	0,02
	12-16	12	-
.....			
6-11 + 12-16 solvolysés colonne de célite système A	tubes 9-17 (migration Δ^5 -P)	12	-
	20-27 (migration 17OH-P + DHA)	2,5	-

<u>CH_2Cl_2 (stéroïdes libres)</u>			
colonne de célite système A	tubes 1-4	1,6	23
	8-14 (migration Δ^5 -P)	4,5	0,5
	26-31 (non identifié)	3,8	0,2

Résultats

a) La majeure partie de la radioactivité C^{14} extraite a été retrouvée sous forme de composé libre très peu polaire, probablement du cholestérol non transformé. Cette fois encore, il n'y a pas eu de stéroïdes sulfoconjugués formés à partir du cholestérol, et ce stérol n'a participé que très faiblement à la synthèse de stéroïdes libres.

b) La Δ_5 -prégnénolone, par contre, a été sulfoconjuguée et a été transformée en 17-hydroxyprégnénolone ou déhydroépiandrostérone qui ont également été isolés sous leur forme sulfoconjuguée (fig. 6). Il n'est pas possible dans cette expérience de dire si les stéroïdes ont été métabolisés sous leur forme conjuguée ou leur forme libre, mais les sulfates isolés représentent deux fois plus de radioactivité que les libres, donc la sulfoconjugaison est favorisée dans ces conditions.

c) Le SU 9055 a provoqué les effets prévus puisque dans la chromatographie des composés libres extraits par le dichlorométhane (fig. 6A) le pic dû à la 17-hydroxyprégnénolone ou/et à la déhydroépiandrostérone a disparu complètement lorsque l'incubation a été faite en présence de SU 9055. Dans la figure 6 (B et C) on peut voir que le SU 9055 a aussi empêché la formation du composé sulfoconjugué qui migre dans le deuxième pic (B) et dans le pic correspondant à la 17-hydroxyprégnénolone et déhydroépiandrostérone après solvolysé (C).

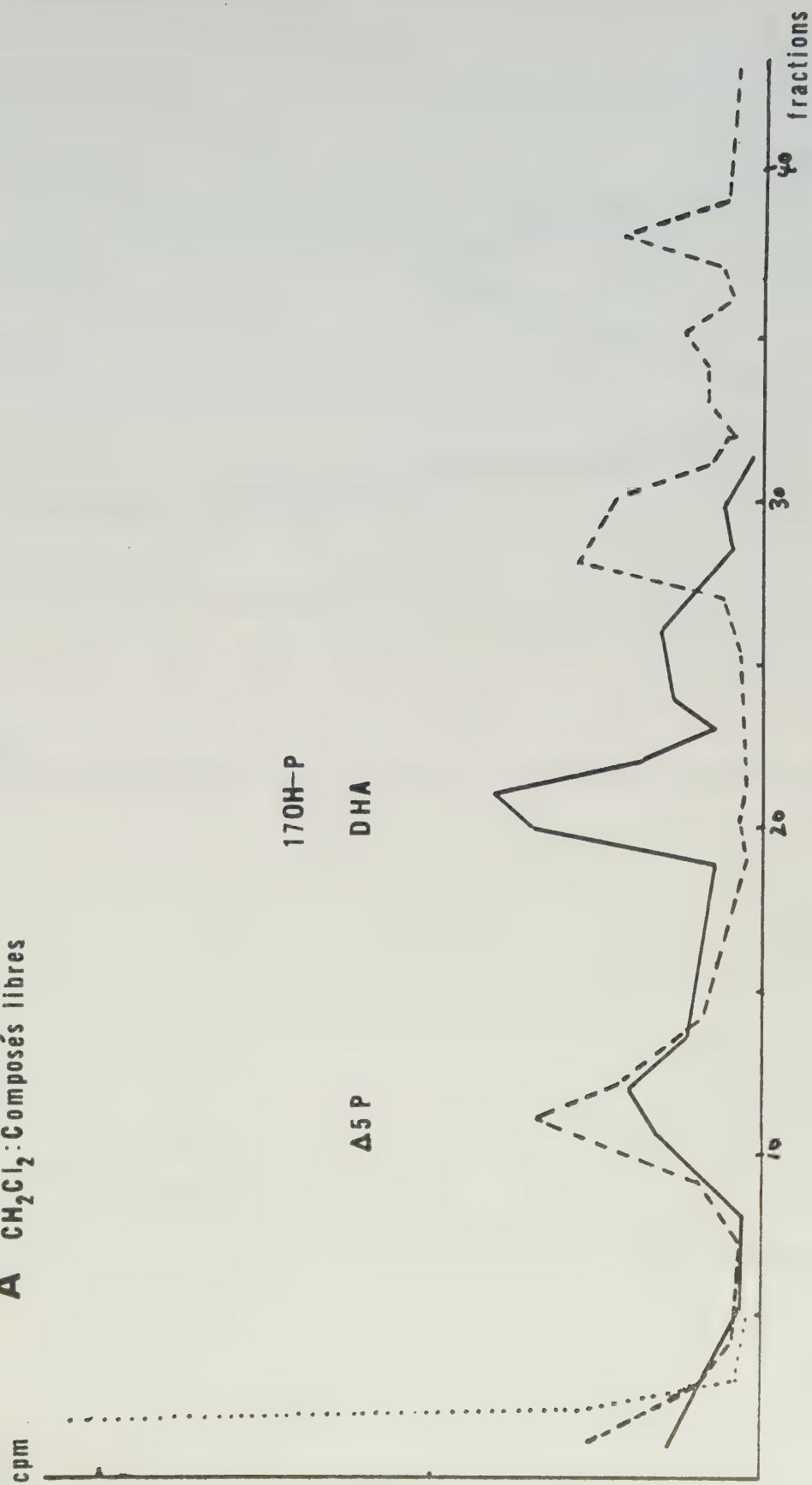
Figure 6

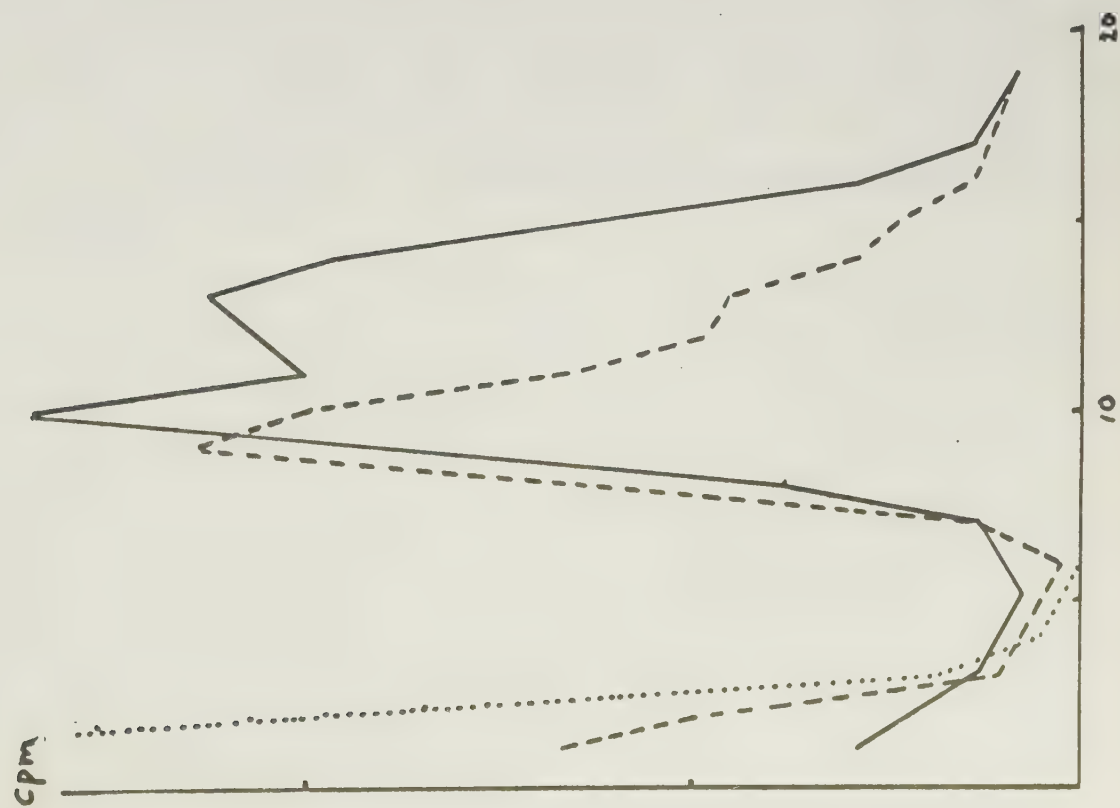
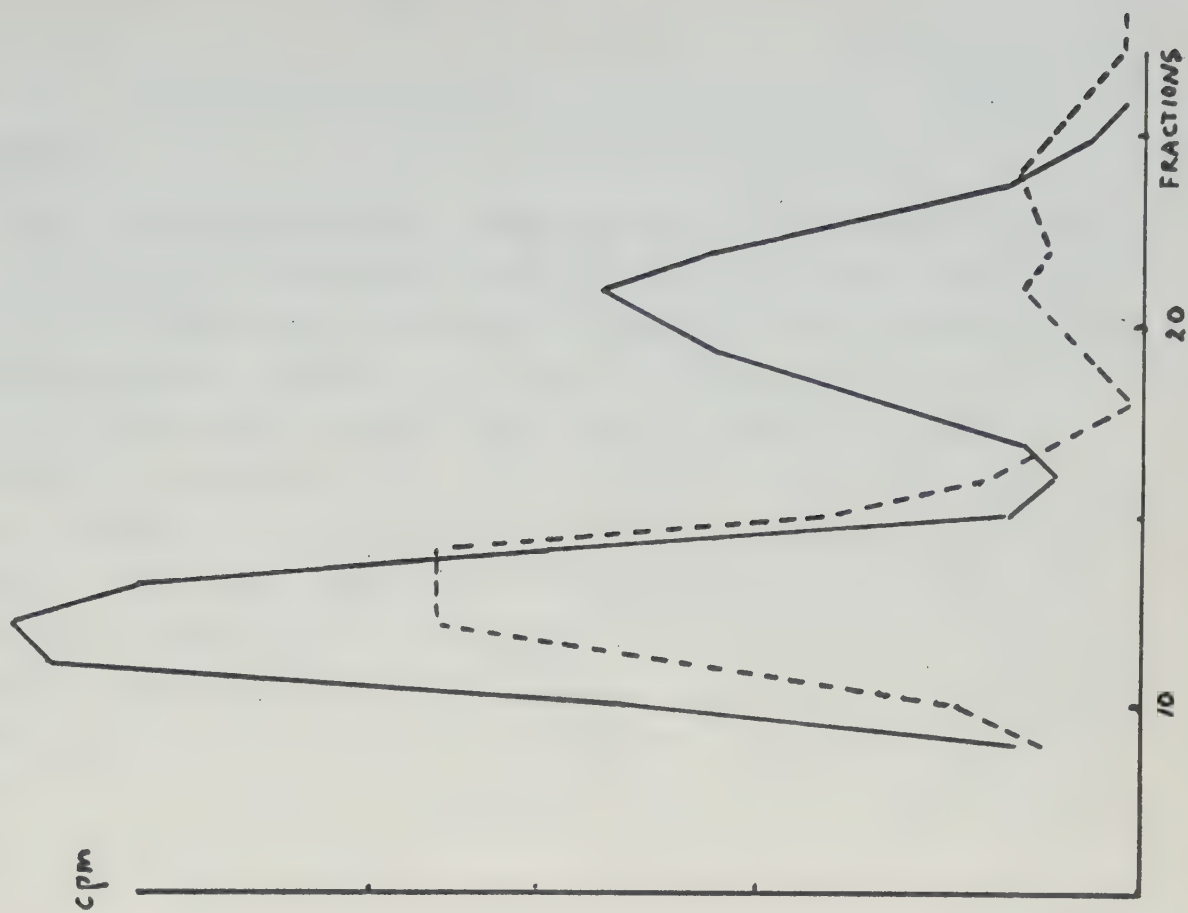
Incubations 2 et 3 :

Chromatographie sur colonne de célite dans les
systèmes A (A et C) et H (B).

.... C^{14} (cholestérol)
— H^3 incubation 2
--- H^3 incubation 3

A CH_2Cl_2 : Composés libres



B H_2O : Sulfates**C** H_2O : apres Solvolyse

Conclusion

Nous avons constaté que dans nos conditions d'incubation, avec des coupes de surrénale humaine, un précurseur connu des hormones stéroïdiennes tel que la Δ_5 -prégnénolone est métabolisé et sulfoconjugué, tandis que le cholestérol participe peu ou pas à la biosynthèse de stéroïdes. Cela pourrait être dû au cholestérol intracellulaire, qui diluerait le traceur incubé d'une manière beaucoup plus importante que la Δ_5 -prégnénolone endogène. Cependant, dans une incubation de cholestérol marqué avec un homogénat du même tissu surrénalien, le stérol a été métabolisé et on a retrouvé dans la phase aqueuse après extraction plusieurs sulfates plus polaires que le sulfate de cholestérol (dont l'un pouvait être du sulfate de Δ_5 -prégnénolone) mais pas de sulfate de déhydroépiandrostérone.

La pénétration dans la cellule pourrait donc être un facteur limitant pour l'action du cholestérol, et ceci semble confirmé par le travail de Hall et Koritz (45), démontrant que l'adjonction de ions Ca^{++} ou la congélation préalable du tissu favorisent la conversion de cholestérol en corticostérone dans des homogénats de surrénales de rat.

3° - Métabolisme in vivo du cholestérol et du sulfate de cholestérol.

Les expériences in vitro et par perfusion de la surrénale in situ n'ayant pas apporté d'éclaircissements sur le métabolisme du sulfate de cholestérol, nous avons décidé de l'étudier in vivo (63). En effet, la reproduction in vitro de réactions physiologiques pose de nombreux problèmes, dont entre autres, ceux du milieu d'incubation (force ionique, pH, pression osmotique), de l'arrivée des traceurs exogènes aux sites enzymatiques, de l'irrigation des tissus et de leur oxygénation. Dans une étude in vivo ces problèmes sont éliminés, seulement lors de l'interprétation des résultats il faut tenir compte de nombreux facteurs. Dans le cas du cholestérol, par exemple, la majeure partie du cholestérol "actif", non immobilisé dans les lipides, sert à la synthèse des acides biliaires, et est éliminé par voie fécale, mais le cholestérol circulant participe, bien qu'en plus faible quantité, à la biosynthèse des hormones stéroïdes. On pouvait craindre que du cholestérol marqué, introduit dans la circulation, soit tellement dilué par le cholestérol endogène que sa contribution à la synthèse des hormones ne soit plus décelable dans les métabolites urinaires de celles-ci.

Par des expériences de Chobanian et Hollander (23) on savait qu'après injection de cholestérol-C¹⁴, un équilibre complet entre le cholestérol plasmatique et celui du rein, poumon, surrénale et intestin était atteint au bout de 20 jours et demeurerait stable pendant au moins 7 mois, et Chevallier (22) avait démontré qu'il en était de même au bout de 10 jours, dans le foie, la surrénale et l'intestin du rat après alimentation à base de cholestérol marqué. Slaunwhite, Sandberg et coll. (97) d'autre part, avaient analysé pendant 80 jours les métabolites stéroïdiens urinaires d'un malade auquel ils avaient injecté une dose

traceuse de cholestérol : ils n'ont récupéré que 6 % de la radioactivité injectée, avec un maximum d'excrétion le 4ème jour ; c'est aussi ce qu'avait trouvé Bloch (14) en observant le pregnandiol urinaire après injection de cholestérol deutérié. D'autres expériences avaient démontré que les corticostéroïdes proviennent uniquement du cholestérol circulant chez le Chien (58) et chez le Cobaye (117).

Quant au sulfate de cholestérol, on savait au moment où cette expérience a été réalisée, qu'il en existait dans la surrénale bovine (32) et dans le sang et les calculs biliaires de l'homme (33) mais rien ne prouvait que le composé circulant participait à la synthèse des hormones stéroïdes et/ou à leurs sulfates. Lieberman et ses collaborateurs (91) avaient réalisé une expérience in vivo dans des conditions particulières qui semblait démontrer que le sulfate de cholestérol est bien le précurseur du sulfate de déhydroépiandrostérone surrénalien ; après avoir injecté du sulfate- S^{35} de cholestérol- H^3 dans l'artère irriguant une glande surrénale tumorale, ils avaient retrouvé dans les urines de la malade du sulfate de déhydroépiandrostérone doublement marqué comme le traceur injecté. Cependant, ces résultats n'ont jamais été reproduits, et les auteurs ont reconnu depuis (44) que dans ce cas pathologique la perméabilité des cellules devait être altérée et permettre des réactions qui n'auraient pas lieu dans un tissu normal.

Nous avons voulu comparer la contribution du cholestérol et du sulfate de cholestérol circulants à la biosynthèse des hormones et mettre en évidence une éventuelle contribution privilégiée du sulfate de cholestérol à la synthèse de stéroïdes sulfoconjugués ; cela aurait confirmé l'existence d'une voie indépendante de biosynthèse des sulfates. Nous avons pensé que si

Si on injectait à un homme par voie intraveineuse du cholestérol et du sulfate de cholestérol marqués, il était vraisemblable qu'une partie au moins de ces précurseurs arriverait à la surrénale et participerait à la formation des stéroïdes. Si le cholestérol était à l'origine de toutes les hormones stéroïdiennes comme on le pensait, toutes ces hormones ainsi que leurs métabolites urinaires seraient marqués, et leur activité spécifique indiquerait l'importance de la contribution du cholestérol à leur synthèse. Il en allait de même pour le sulfate de cholestérol si celui-ci était un précurseur des stéroïdes surrénaliens ou de leur sulfates. En injectant du cholestérol- C^{14} et du sulfate de cholestérol tritié, on pouvait admettre que la quantité des deux isotopes isolés dans les métabolites urinaires des hormones décrirait le métabolisme subi par chacun des précurseurs et on pouvait ainsi comparer leur contribution à la synthèse hormonale :

$$R = \frac{H^3/C^{14} \text{ des métabolites}}{H^3/C^{14} \text{ des produits de départ}} = \frac{\text{contribution du précurseur } H^3}{\text{contribution du précurseur } C^{14}}$$

Le R, qui mesure la contribution respective instantanée des précurseurs a rapidement atteint dans cette expérience une valeur constante, indiquant l'établissement d'un équilibre entre les précurseurs.

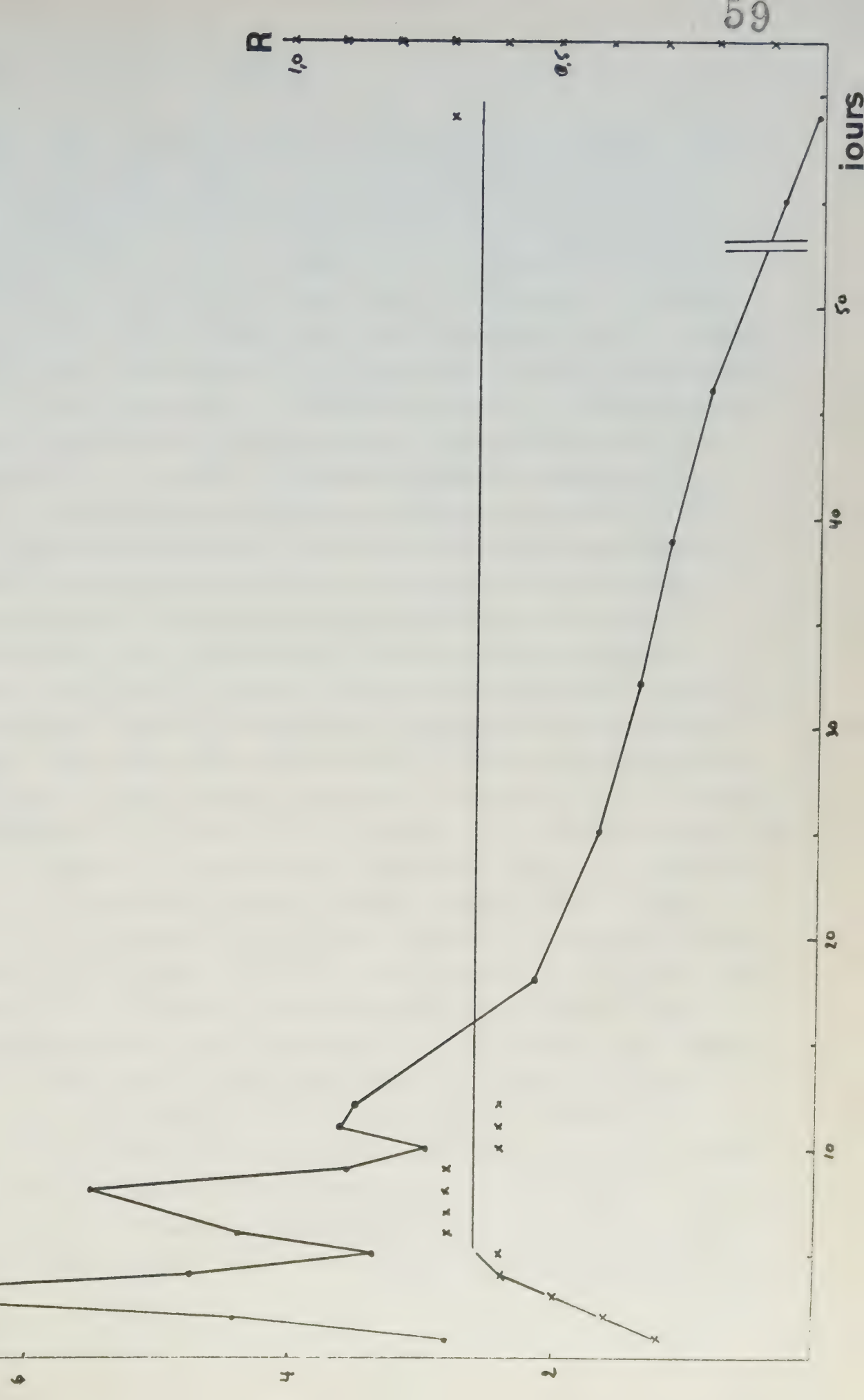
La transformation des précurseurs radioactifs en corticostéroïdes a été étudiée dans sa totalité, puisque les urines ont été collectées depuis les premières heures après l'injection

Figure 7

Elimination urinaire des métabolites du sulfate
de cholestérol- H^3 et contribution du cholestérol et de
son sulfate aux métabolites urinaires glucuroconjugués.

% Inj. $\times 10^2$

- Elimination urinaire de métabolites ^3H
- x— R dans les métabolites – glucuroconjugués

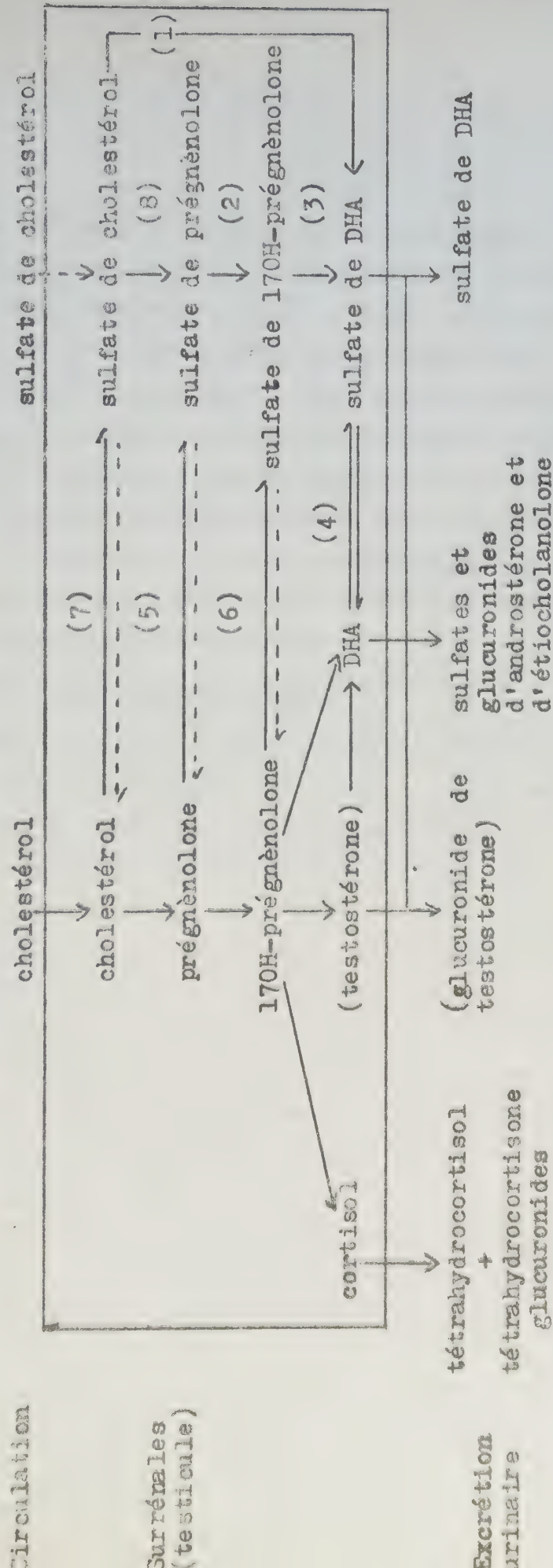


jusqu'au jour où l'élimination des métabolites urinaires radioactifs était nulle (fig. 7). On peut affirmer que, dans les limites décelables, les résultats donnés dans les figures et tableaux suivants tiennent compte de tout le cholestérol et le sulfate de cholestérol marqués ayant participé à la biosynthèse des corticostéroïdes, dont les métabolites ont été isolés.

La figure 8 schématise ce métabolisme et montre pour quelle raison les glucuronides de tétrahydrocortisol et tétrahydrocortisone, les sulfates et glucuronides d'androstérone et d'étiolanolone et le sulfate de déhydroépiandrostérone ont été isolés et analysés. Une différence entre les rapports H^3/C^{14} de la "voie sulfoconjuguée" et de la "voie libre", indiquerait soit une différence de pénétration des précurseurs dans la glande, soit que les enzymes de la surrénales n'ont pas la même affinité pour les stéroïdes libres et sulfoconjugués.

Les réactions 1-6 ont été mises en évidence dans la surrénale en 1963 et 1964. La conversion in vivo du sulfate de cholestérol doublement marqué en sulfate de déhydroépiandrostérone marqué dans le même rapport isotopique (réaction 1) a été décrite par Lieberman (90) dans un cas de tumeur de la surrénale (voir p57); celle du sulfate de prégnénolone doublement marqué en sulfate de 17-hydroxyprégnénolone portant le même rapport H^3/S^{35} (réaction 2) a été observée in vitro par Calvin et Lieberman (19) dans un homogénat de glande surrénale hyperplasiée. La conversion du sulfate- S^{35} de 17-hydroxyprégnénolone- H^3 en sulfate- S^{35} de déhydroépiandrostérone- H^3 (réaction 3) a été décrite par Lebeau, Alberga et Baulieu (62) dans des coupes de glande surrénale tumorale, la sulfoconjugaison de la déhydroépiandrostérone (réaction 4) a été observée par Wallace et Lieberman (110) dans un homogénat total de tumeur surrénalienne, et celles de la déhydroépiandrostérone, de la prégnénolone, et de la 17-hydroxyprégnénolone (réactions 4, 5 et 6) ont été démontrées par

Biosynthèse et métabolisme des hormones stéroïdes à partir du cholestérol et du sulfate de cholestérol



Lebeau et Baulieu (60) dans un surnageant 105.000 x g de tumeur surrénalienne. Les réactions 4 et 5 ont été mises en évidence dans un surnageant 100.000 x g de surrénales normales par Adams (1,2). Il a fallu attendre 1966 pour que la sulfoconjugaison du cholestérol (réaction 7) soit enfin démontrée in vitro par Banerjee et Roy (4) avec une sulfotransférase isolée de foie de cobaye, et 1967-1968 pour que cette réaction soit décrite par Rice et coll. (87) dans la fraction soluble d'un homogénat de rein de rat, et que la réaction 8 soit démontrée in vitro par Roberts et Lieberman (92) et Young et Hall (124) grâce à des enzymes mitochondriaux isolés de surrénales bovines.

a) Partie expérimentale

Une première expérience avait été tentée en injectant 37 μC de sulfate de cholestérol $7\alpha\text{-H}^3$ et 3 μC de cholestérol 4-C^{14} , ce qui représentait un rapport $\text{cpm H}^3/\text{cpm C}^{14}$ de 6,4. Tous les métabolites urinaires isolés, qu'il dérivent des corticostéroïdes ou des androgènes, avaient un rapport H^3/C^{14} oscillant autour de 2-3. Ceci indiquait que le cholestérol libre était un meilleur précurseur des hormones surrénaliennes que son sulfate. Malheureusement, la quantité de radioactivité recueillie dans les urines en 6 jours après l'injection était si faible que ces résultats étaient très imprécis, et il a été décidé de recommencer l'expérience en injectant davantage de radioactivité et en analysant les urines au cours d'une période plus longue.

195 μC de sulfate de cholestérol $7\alpha\text{-H}^3$ (activité spécifique 29,5 $\mu\text{C}/\text{mg}$) et 13,5 μC de cholestérol 4-C^{14} (activité spécifique 0,05 mC/mg) ont été injectés par voie intraveineuse à un

homme jeune leucémique, mais normal au point de vue endocrinologique. Le rapport cpm H^3 /cpm C^{14} des 2 composés à l'injection était de 7. Les urines de 12 jours après l'injection ont été étudiées et un contrôle de la radioactivité excrétée a été maintenu jusqu'au 59ème jour. La radioactivité des urines a été déterminée par comptage dans du "Diotol" (voir Techniques, C,1) sans correction pour l'atténuation (fig. 7). 1 % du tritium et 2,5 % du C^{14} ont été excrétés en 3 mois. Le rapport cpm H^3 /cpm C^{14} a été calculé, et demeure plus faible que celui des produits injectés tout au long de l'excrétion urinaire ($R < 1$, fig. 7). L'extraction et la purification des glucuro et sulfo-conjugués est décrite dans les schémas 1-3.

Les urines des 7ème, 8ème et 9ème jour ont été solvolysées avant l'hydrolyse enzymatique (voir Techniques, A,4) afin d'éviter que les sulfoconjugués soient hydrolysés avec les glucuroconjugués par la β glucuronidase (qui en général contient également des sulfatases), et d'étudier plus spécialement les métabolites sulfoconjugués. Les urines des 2ème et 3ème jour et des 5ème et 6ème jour ont été réunies et traitées ensemble.

Après hydrolyse, les stéroïdes provenant des fractions glucuro et sulfoconjuguées ont été purifiés et dosés (schémas 2 et 3).

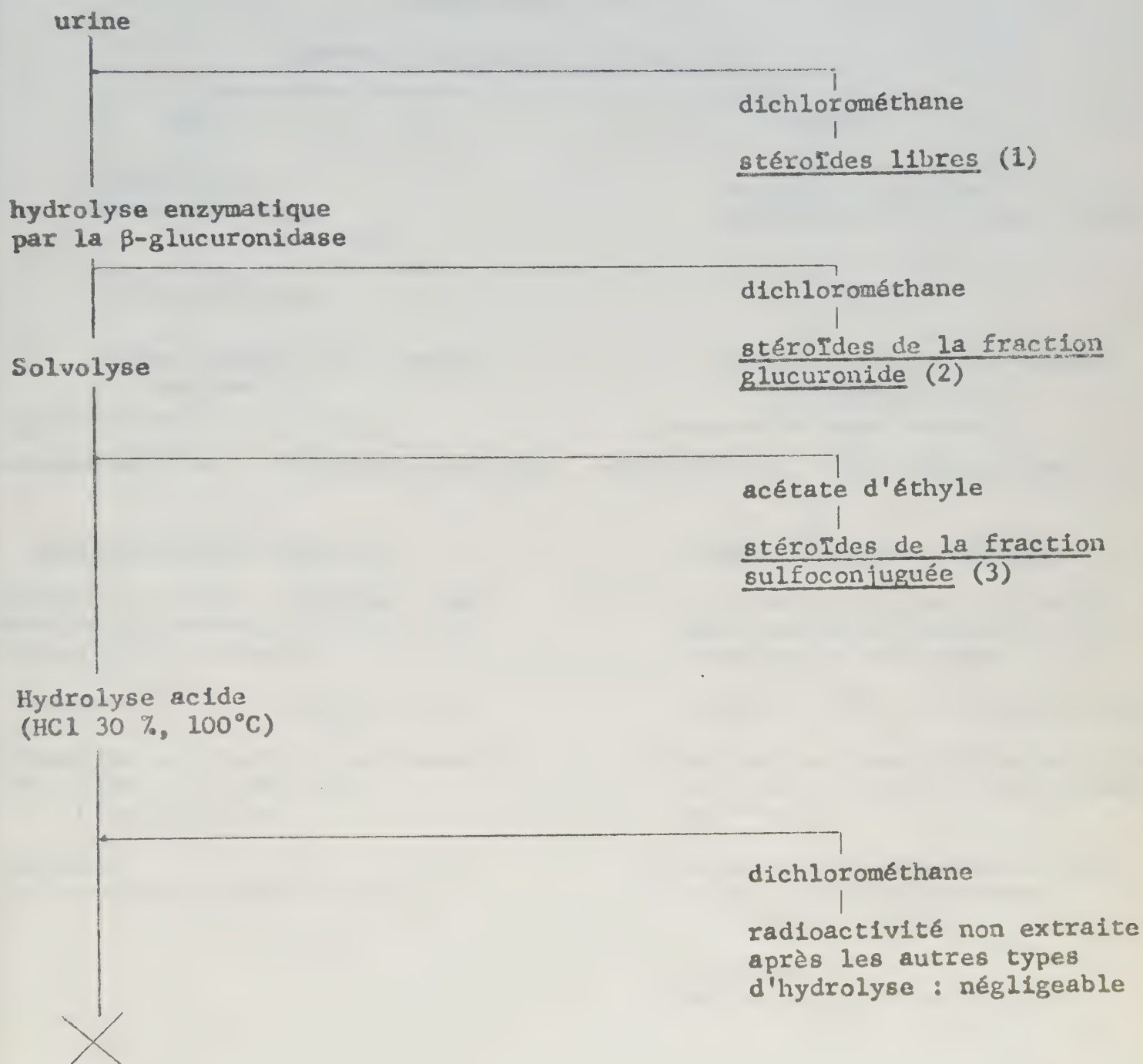
Les stéroïdes libres, qui ne représentaient qu'un très faible pourcentage de la radioactivité excrétée, n'ont pas été analysés.

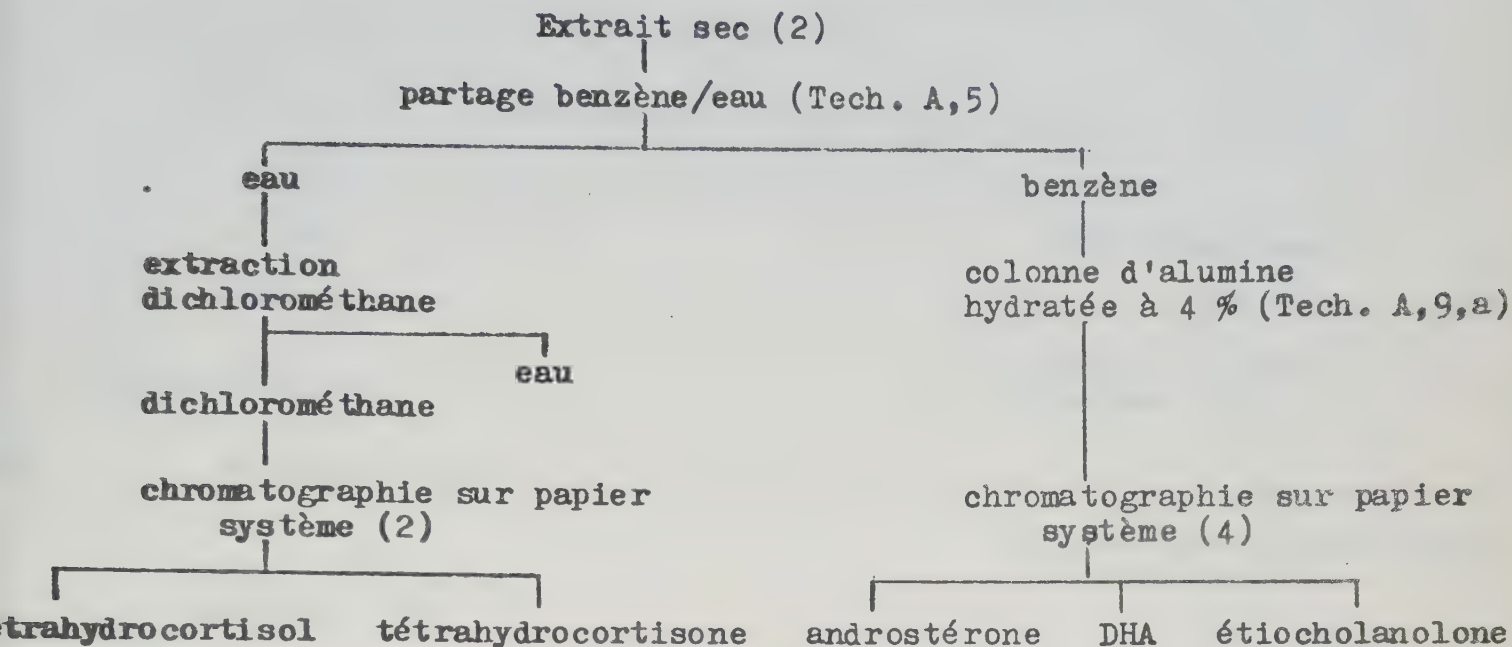
b) Résultats

La contribution relative du cholestérol- C^{14} et du sulfate de cholestérol- H^3 aux métabolites urinaires des stéroïdes surrenaliens figure après extraction au tableau VI, et après purification au tableau VII. Les rapports H^3/C^{14} ainsi que les activités spécifiques des métabolites purifiés sont donnés dans la figure 9 et dans le tableau VIII.

SCHEMA 1

Extraction des urines



Purification de la fraction glucuroconjuguéeIdentification, comptage

colonne de célite, système C puis
recristallisations répétées avec
stéroïde de référence

↓
rapport H^3/C^{14} et identification

dosage en colorimétrie par réaction
avec bleu de tétrazolium
(Tech. A,12,c)

comptage
2-3 → activité spécifique

Identification, comptage

1) colonne de célite, système A
puis recristallisations avec
stéroïde de référence

↓
rapport H^3/C^{14} et identification

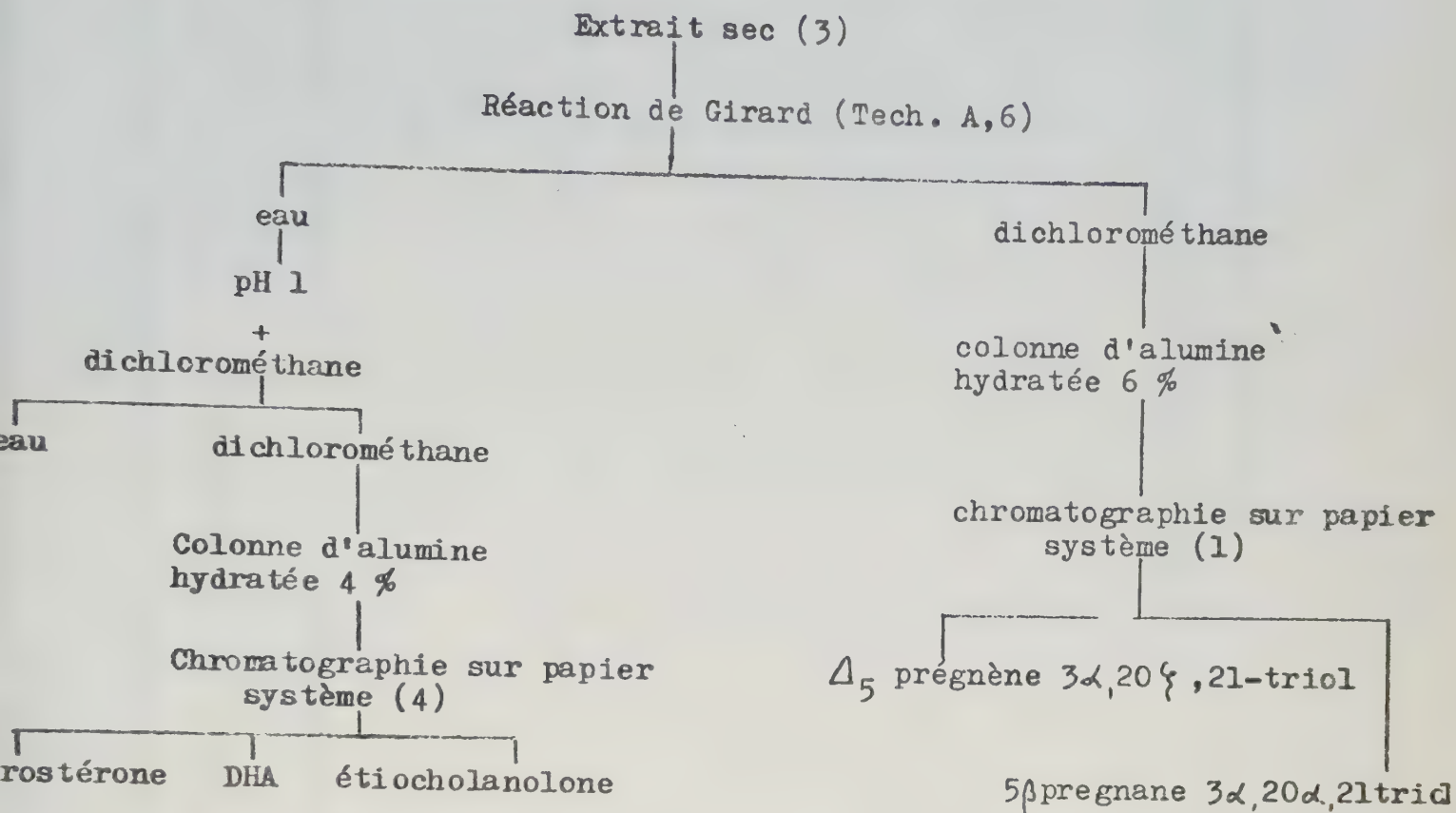
2) estimation quantitative en chroma-
tographie sur papier avec gamme
de témoins

3) colonne de silice-célite puis
dosage par microzimmerman
(Tech. A,12,b)

4) comptage
2-4 → activité spécifique

Schéma 3

Purification de la fraction sulfoconjuguée



Identification, comptage

colonne de célite système C puis
recristallisations
↓
rapport H^3/C^{14} et identification
estimation quantitative par chroma-
tographie avec gamme de témoins.
colonne de silice-célite et dosage
par microzinnerman (Tech. A,12,b)
comptage

2-4 → activité spécifique

en quantité négligeable

Contribution relative du sulfate de cholestérol-H³ et du cholestérol-C¹⁴ aux stéroïdes
urinaires glucuro- et sulfo-conjugués.

JOUR	METABOLITES R°	GLUCUROCONJUGUES	METABOLITES R	SULFOCONJUGUES
1	0,3		0,3	
2	0,4		0,4	
3	0,5		0,6	
4	0,6		0,6	
5	0,6		0,7	
6	0,7		0,6	
7	0,7		0,5	
8	0,7		0,5	
9	0,7		0,6	
10	0,6		0,9	
11	0,6		0,7	
12	0,6		0,6	
58 et 59	0,7		0,7	

R =	H ³ /C ¹⁴ des métabolites	Contribution du sulfate de cholestérol-H ³
	H ³ /C ¹⁴ des composés administrés	Contribution du cholestérol-C ¹⁴

contribution du sulfate de cholestérol-H³

Métabolites urinaires purifiés : R =

contribution du cholestérol-C¹⁴

Métabolite	1er jour	2è et 3è jour	4è jour	5è et 6è jour	7è jour	8è jour	9è jour
Androstérone (glucuronide + sulfate)	0,23	0,58		0,72	G S 0,72 0,68	0,72	0,74
Etiocolanolone (glucuronide + sulfate)	0,22	0,58		0,72	G S 0,70 0,61	0,72	0,75
Déhydroépiandrostérone (sulfate)		0,50	0,78				
Tétrahydrocortisone (glucuronide)	0,19	0,39	0,65	0,69	0,68	0,69	0,69
Tétrahydrocortisol (glucuronide)	0,32	0,45	0,67		0,54	0,49	0,43

Figure 9

Rapport H^3/C^{14} dans les métabolites urinaires
purifiés des stéroïdes surrénaliens.

A : ANDROSTERONE
E : ETIOCHOLANOLONE
TE: TETRAHYDROCORTISONE
TF: TETRAHYDROCORTISOL
D : DEHYDROISOANDROSTERONE

 H_3 / C_{14}

INJECTION

JOURS

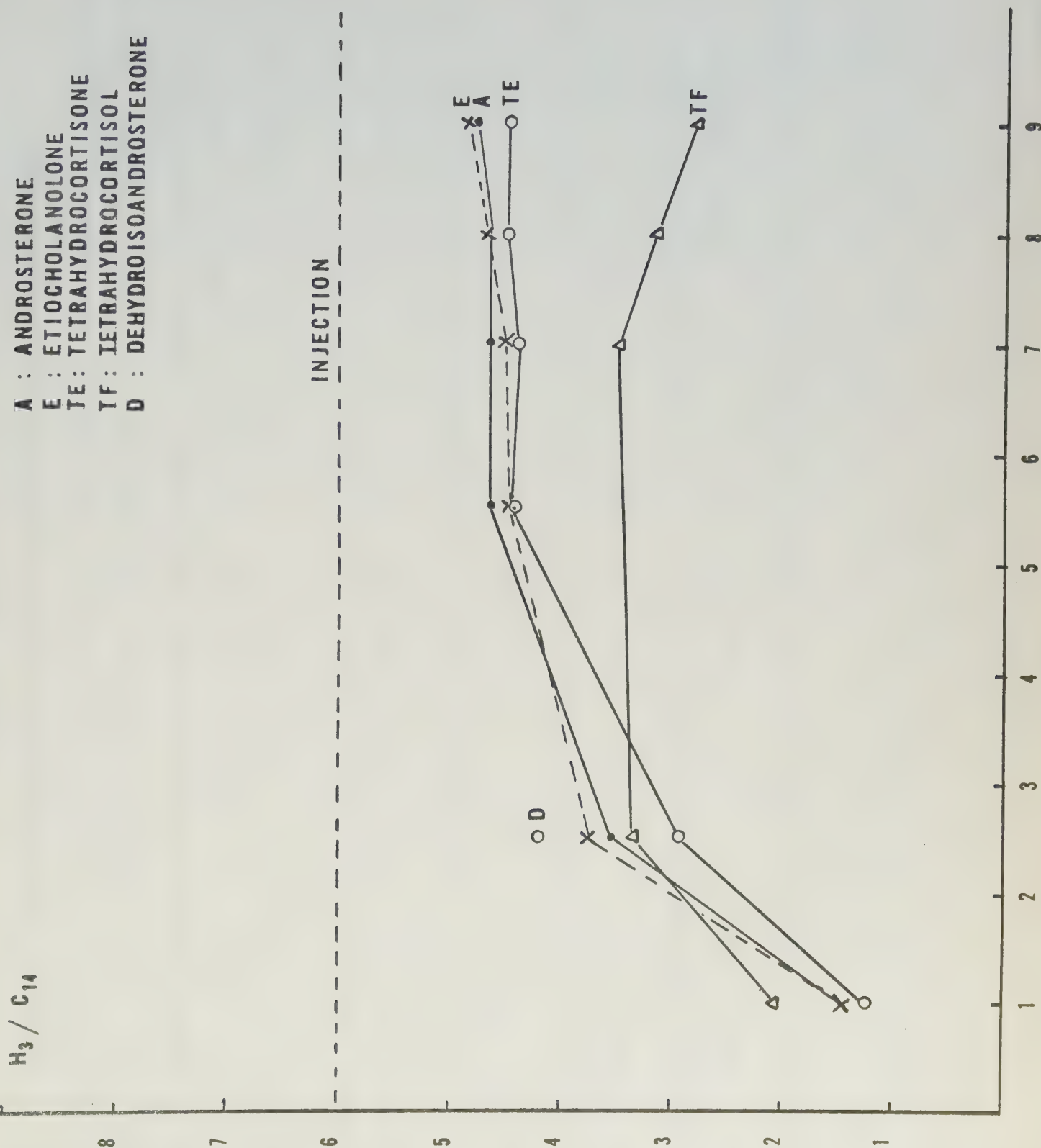


Tableau VIII

Activités spécifiques des métabolites urinaires purifiés, en com/ μ g

Métabolite	1er jour	2è et 3è jour	4è jour	5è et 6è jour	7è jour	8è jour	9è jour
	H^3 C^{14}	H^3 C^{14}	H^3 C^{14}	H^3 C^{14}	H^3 C^{14}	H^3 C^{14}	H^3 C^{14}
Androstérone	0,4 0,3	2,4 0,7		2,8 0,6	2,5 0,5	2,5 0,5	2,2 0,5
Etiocanolone	0,4 0,3	2,0 0,6	2,4 0,4		2,9 0,6	2,9 0,5	2,1 0,4
Déhydrocépiandrostérone			1,6 0,3				
Tétrahydrocortisone	0,3	2,7 0,9	1,9 0,4	2,6 0,8	4,6	2,9 0,7	2,3 0,6
Tétrahydrocortisol	0,2	3 1,0	2,6 0,7		3,1 0,8	2,0 0,5	2,0 0,3

c) Conclusions

1) Le cholestérol et le sulfate de cholestérol circulants sont des précurseurs de toutes les hormones surrénaliennes envisagées.

2) Les rapports H^3/C^{14} dans tous les métabolites sont plus petits que celui des composés injectés (fig. 8). Ceci indique que le cholestérol est un meilleur précurseur des hormones dont dérivent ces métabolites, que le sulfate de cholestérol. Ce résultat est encore renforcé du fait que la concentration plasmatique du cholestérol est 100 fois plus grande que celle du sulfate, et que le cholestérol injecté est donc dilué 100 fois plus que ne l'est le sulfate avant d'être métabolisé.

3) La similitude des rapports H^3/C^{14} dans les métabolites des androgènes (androstérone et étiocholanolone) et dans ceux du cortisol et de la cortisone (tétrahydro dérivés) suggère que ces deux types de composés ont des précurseurs communs, qu'il n'y a pas de voie de biosynthèse privilégiée des stéroïdes sulfoconjugués parallèle à celle des libres, mais que ceux-ci s'interconvertissent à toutes les étapes du métabolisme. Ces résultats permettent de penser qu'un équilibre s'établit déjà au niveau du cholestérol entre sa forme libre et sulfate, à la périphérie avant l'entrée dans les glandes. Cela est possible puisque Burstein et Dorfman ont décrit des sulfatases dans de nombreux tissus (17), Banerjee et Roy (4) ont observé la sulfoconjugaison du cholestérol dans le foie de cobaye, et que Moser et coll. (71) ont isolé du sulfate de cholestérol dans un grand nombre de tissus chez l'homme.

4) La similitude des activités spécifiques des deux types de métabolites vient confirmer l'hypothèse d'un précurseur commun dont dériveraient tous les stéroïdes, libres et sulfoconjugués. Comme il est dit plus haut ce précurseur commun pouvait être le cholestérol circulant.

5) Le facteur R, qui augmente entre le 1er et le 5ème jour pour se stabiliser ensuite, indiquerait une lente hydrolyse du sulfate de cholestérol, démontrant par conséquent que le sulfate ne participe à la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens qu'après son hydrolyse probablement périphérique.

6) Contrairement à ce qui avait été suggéré, le sulfate de cholestérol circulant n'est pas un précurseur privilégié des sulfates de stéroïdes 3β -hydroxy Δ 5, et ceux-ci sont formés soit à partir de cholestérol sulfoconjugué dans la surrénale (mais cela n'a jamais été démontré), soit sous forme libre, à partir de cholestérol libre, puis sulfoconjugués in fine avant leur sécrétion.

Ces résultats obtenus in vivo ont été confirmés par ceux de Kaggatt et Whitehouse (86) qui ont étudié in vitro l'activité de la cholestérol oxidase isolée de surrénales bovines avec, comme substrats, le cholestérol et son sulfate. Ils ont trouvé que l'enzyme transformait les deux composés mais que le cholestérol libre était le substrat préféré avec un Km 10 fois plus petit que celui trouvé pour le sulfate. L'équipe de Lieberman a également fait une étude du métabolisme du sulfate de cholestérol en stéroïdes hormonaux, et a également trouvé que le sulfate de cholestérol circulant n'était pas un précurseur privilégié des hormones stéroïdes (44).

C H A P I T R E .IV.

MISE EN EVIDENCE DES INTERACTIONS DE CERTAINS STEROIDES SULFOCONJUGUES AVEC LA TRANSCORTINE HUMAINE.

Le rôle des stéroïdes sulfoconjugués est encore mal connu ; Baulieu et Dray (9), Siiteri et Mac Donald (102) ont décrit la transformation in vivo de sulfate de déhydroépiandrosterone en oestrogènes placentaires chez la femme enceinte, et Harper (46) a récemment décrit une action oestrogénomimétique du sulfate de déhydroépiandrosterone, indépendante de celle de la déhydroépiandrosterone libre, chez la Rate, ces actions étant dues l'une à une "protection" du stéroïde contre le métabolisme hépatique (9,102), l'autre à un métabolisme différent du composé libre et du sulfate (46). Pour les sulfates de stéroïdes dont l'éventuel rôle physiologique ne pouvait pas être expliqué par une forte concentration ou une longue demi-vie dans le sang, il fallait trouver un autre mode d'action par lequel une faible quantité d'hormone sulfoconjuguée pourrait exercer un contrôle sur la quantité d'hormone libre disponible.

Milgrom et Baulieu (70) ont montré que les stéroïdes sulfoconjugués peuvent être substrats ou inhibiteurs compétitifs de certains enzymes qui métabolisent les stéroïdes libres. Les sulfates peuvent donc entrer en compétition avec les hormones actives pour les sites catalytiques de ces enzymes et éventuellement pour les sites de liaison des protéines plasmatiques, et exercer ainsi une régulation sur le métabolisme des stéroïdes et sur l'activité hormonale (11).

Il était intéressant d'étudier les interactions du sulfate de corticostérone avec les protéines plasmatiques qui "transportent" les corticostéroïdes.

On sait qu'il existe entre la corticostérone libre et une glycoprotéine sérique, la transcortine, des interactions de type non covalent faisant intervenir des énergies faibles, caractéristiques de liaisons hydrogènes ou de forces de Van der Waals (96,118)

Seuls certains stéroïdes porteurs d'un groupement Δ^4 3-cétonique sont liés à la protéine avec une grande constante d'association (29,96,118). D'autre part, il existe entre les anions (les sulfates, par exemple) et la sérum albumine, des interactions de type électrostatique qui ont été largement décrites (53,84 85,93,111). Le sulfate de corticostérone porteur des 2 types de fonctions paraissait être un bon modèle pour étudier l'influence respective du groupement Δ^4 3-cétonique et du sulfate sur la liaison de stéroïdes sulfoconjugués aux protéines du plasma.

Enfin, la différence des demi-vies du sulfate de corticostérone (0,8 h.) et du sulfate de déhydroépiandrosterone (6-8 h.) suggérait un mode de liaison et/ou une distribution très différente pour les 2 composés dans le plasma.

Des expériences préliminaires, faites avec du plasma dilué, ont montré que le sulfate de corticostérone était lié à un facteur thermolabile et qui augmentait pendant la grossesse, deux caractéristiques de la transcortine. Nous avons donc isolé la transcortine et considéré la liaison des sulfates de corticostérone et de testostérone à la protéine à diverses étapes de sa purification.

Tableau IX

Liaison de la corticostérone, du sulfate de corticostérone et du sulfate
de déhydroépiandrostérone au plasma humain.

	<u>Plasma de femme normale</u>		<u>Plasma de femme enceinte</u>	
	chauffé 20' à 60°		chauffé 20' à 60°	
Corticostérone	95,2	54,0	98,5	60,2
Sulfate de corticostérone	90,7	81,7	96,3	82,8
Corticostérone	93,7	83,1	97,4	86,0
Sulfate de déhydroépiandrostérone	98,0	95,0	98,1	95,4

- 75 -

Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison :

stéroïde lié x 100/stéroïde total dans le sac de dialyse

A - Liaison du sulfate de corticostérone aux protéines plasmatiques

1° - Dialyse à l'équilibre

La liaison du sulfate de corticostérone aux protéines du plasma de femme normale et de femme enceinte a été étudiée par dialyse à l'équilibre (voir Techniques D,6,c), avant et après chauffage du plasma 20 minutes à 60° C (ce qui inactive une grande partie de la transcortine), et comparée à la liaison de la corticostérone libre et du sulfate de déhydroépiandrosterone.

1,5 ml de plasma, débarrassé des stéroïdes endogènes par filtration sur Sephadex G-25 à 45° C (119) et dilué au quart dans une solution de NaCl 0,9 %, ont été dialysés 48 heures à 4° C contre 15 ml de solution saline contenant les stéroïdes radioactifs. De la corticostérone tritiée ($4,7 \times 10^{-7}M$) et son sulfate C^{14} ($2 \times 10^{-5}M$) d'une part, et du sulfate de déhydroépiandrosterone ($2 \times 10^{-7}M$) et du sulfate de corticostérone- C^{14} ($2 \times 10^{-5}M$) d'autre part, ont été dialysés parallèlement. Les concentrations de stéroïde lié en fin de dialyse étaient de 0,4 à $14,2 \times 10^{-8}M$ dans les diverses expériences. Les résultats exprimés en pourcentage de liaison (voir Techniques D,7,a) figurent au tableau IX.

On voit que

a) davantage de corticostérone et de son sulfate sont liés dans le plasma de femme enceinte que dans le plasma normal, tandis que la quantité de sulfate de déhydroépiandrosterone lié est la même.

b) après chauffage du plasma, la liaison de la corticostérone baisse visiblement, celle de son sulfate baisse un peu moins, tandis que celle du sulfate de déhydroépiandrosterone ne baisse que faiblement.

c) la quantité de sulfate de corticostérone lié en présence de corticostérone est plus faible qu'en présence de sulfate de déhydroépiandrostérone, ce qui suggère une compétition de la corticostérone et de son sulfate pour les mêmes sites de liaison.

Bien qu'en raison des différentes concentrations de stéroïdes employées cette expérience ne puisse pas être interprétée quantitativement, elle démontre qu'en effet, la liaison du sulfate de corticostérone dans le plasma ressemble davantage à celle de la corticostérone libre qu'à celle du sulfate de déhydroépiandrostérone.

Une autre expérience a été faite en dialysant du plasma dilué au 1/20ème et contenant les stéroïdes endogènes, contre du sulfate de corticostérone en concentration d'ordre physiologique (1×10^{-10} M), pour voir si dans des conditions normales le sulfate de corticostérone déplaçait l'hormone libre de ses sites de liaison sur la transcortine. On a observé une liaison de 84 % du sulfate de corticostérone, qui était abaissée à 67 % après chauffage du plasma. Cela indiquait qu'aux concentrations physiologiques, du sulfate de corticostérone est lié à un système thermolabile qui pouvait être la transcortine.

La liaison à 37° C de la corticostérone et de son sulfate à la transcortine a été étudiée dans une expérience de dialyse à l'équilibre (24 heures). La constante d'association est, comme à 4° C, plus grande pour l'hormone libre que pour le sulfate. Il a été vérifié que le sulfate de corticostérone n'était pas hydrolysé, même dans ces conditions.

2° - Technique d'adsorption du ligand libre selon Murphy.

La compétition entre la corticostérone radioactive et des quantités variables de compétiteurs non-radioactifs a alors été étudiée sur des échantillons de 1 ml de plasma 5 % dans le NaCl 0,9 %, par la technique de Murphy (voir Techniques D,6,a). Les résultats montrent que l'oestrone et le sulfate de déhydroépiandrostérone ne déplacent pas la corticostérone de ses sites de liaison (fig.10), tandis que la corticostérone et le cortisol sont les

Figure 10

Compétition entre la corticostérone 1,2-H³ et des compétiteurs non radioactifs (oestrone (O_I), sulfate de déhydroépiandrostérone (SD), corticostérone (B) pour la liaison au plasma 5 %.

M LIÉS

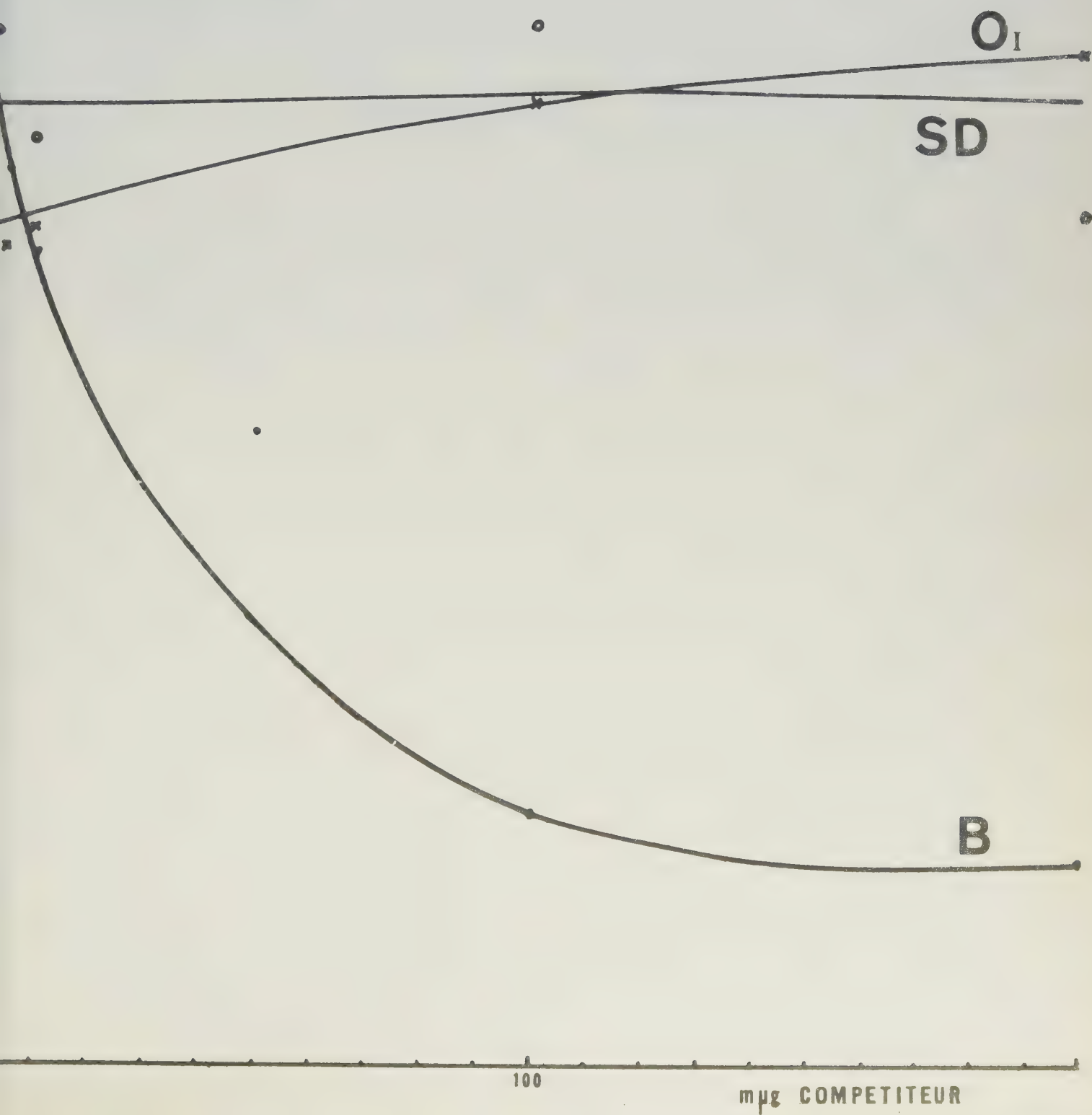
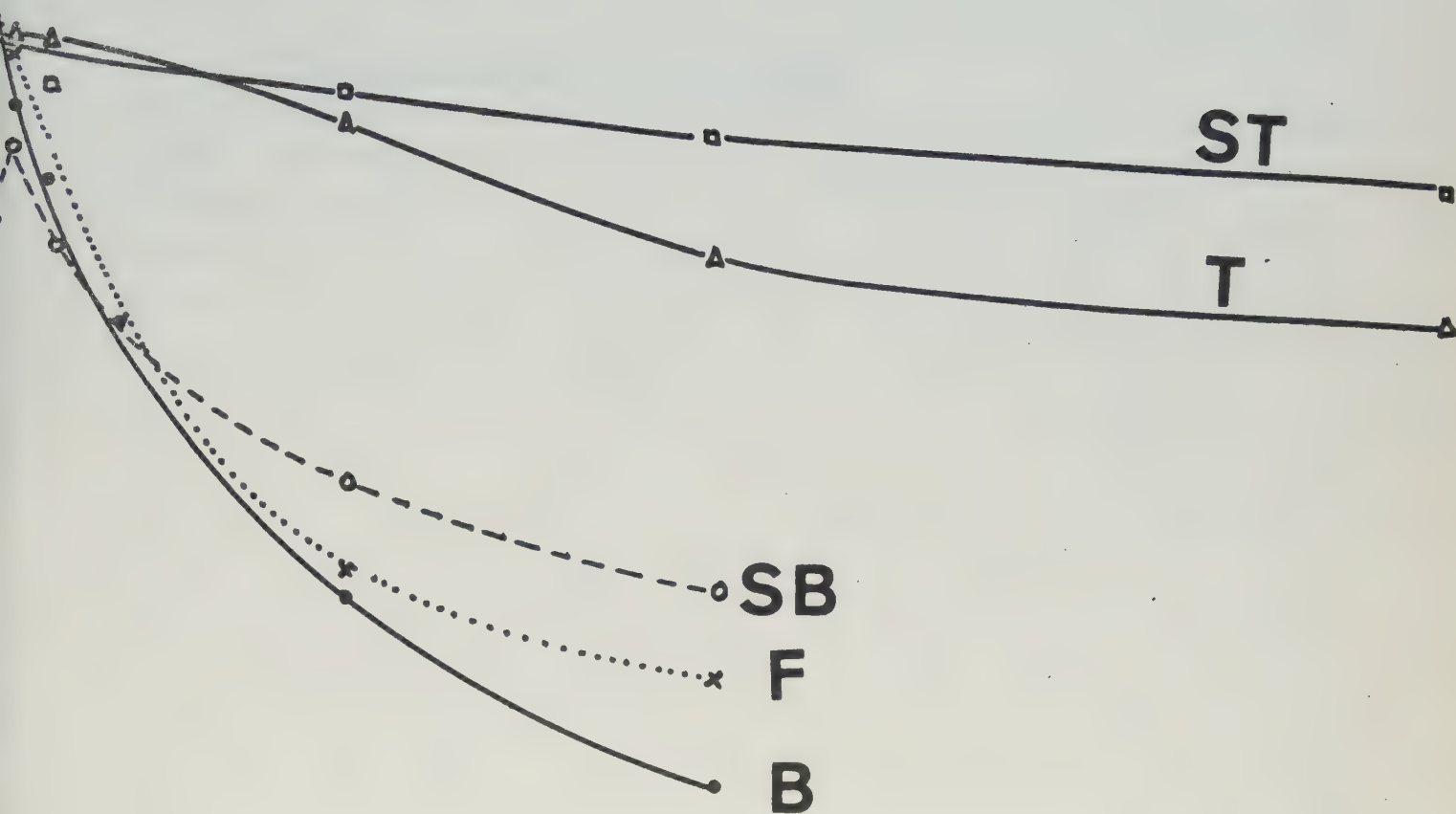


Figure 11

Liaison de la corticostérone 1,2-H³ au plasma 5 % en présence de compétiteurs non radicaactifs (sulfate de testostérone (ST), testostérone (T), sulfate de corticostérone (SB), cortisol (F), corticostérone (B)).

CPM LIÉS



100

mpg COMPETITEUR

meilleurs compétiteurs, suivis du sulfate de corticostérone, de la testostérone et de son sulfate, par ordre d'affinité décroissante (fig. 11).

B - Purification de la Transcortine

La transcortine a été purifiée à partir de fraction IV de Cohn, qui est elle-même préparée par fractionnement alcoolique d'un pool de plasma humain au Centre National de Transfusion Sanguine et qui contient des α et β globulines ainsi qu'un peu d'albumine. La fraction IV, sous forme de pâte alcoolique, est dialysée pendant 3 jours contre du tampon phosphate 0,02 M, pH 7,4, centrifugée 20 minutes à 10,000 tours/min et le surnageant chromatographié sur DEAE-cellulose avec des molarités croissantes de tampon phosphate, ajoutées en gradient discontinu. La transcortine est obtenue dans les éluats 0,045 et 0,050 M (fig. 12 : dans cette expérience la transcortine est éluee par le tampon phosphate 0,050 M), la plus grande partie de l'albumine se trouvant en général dans les éluats de force ionique plus élevée. Les fractions sont concentrées et leur activité de liaison mesurée par dialyse à l'équilibre. Leur contenu en albumine est vérifié par électrophorèse (fig. 13a). La transcortine (fig. 14), qui peut être repérée en électrophorèse par sa liaison au cortisol marqué, migre comme une α_1 -glycoprotéine (96). Les fractions sont conservées à 4° C dans du tampon phosphate 0,05 M contenant de l'ascorbate de sodium 5×10^{-4} M, qui protège la protéine (72) et en présence de ligand lorsque c'est possible (U. Westphal, communication personnelle).

Des essais de purification par précipitation au sulfate d'ammonium ont été faits à ce stade, mais la fraction active, précipitée par le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation, contenait encore de l'albumine et des β -globulines et cette étape a été supprimée.

Figure 12

Purification de la fraction IV de Cohn sur DEAE cellulose, après incubation avec de la corticostérone 1,2-H³ ; élution en fractions de 10 ml par du tampon phosphate 0,05 et 0,06 M, pH 7,4.

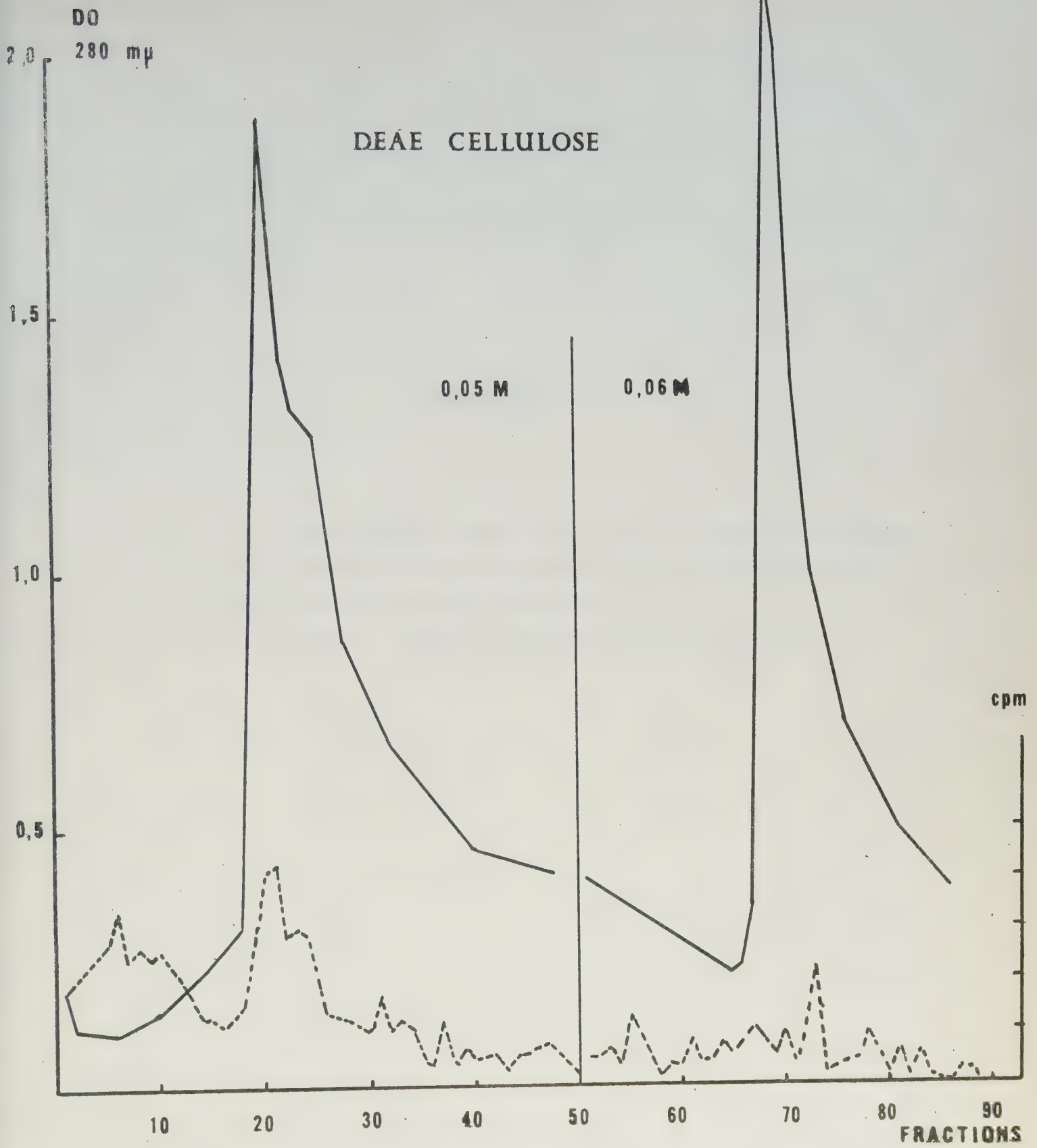


Figure 13

Electrophorèse sur cellogel de fractions contenant de la transcortine après purification partielle sur DEAE cellulose et DEAE Sephadex.

Tampon : véronal sodique 0,048 M, pH 8,6.

Figure 13

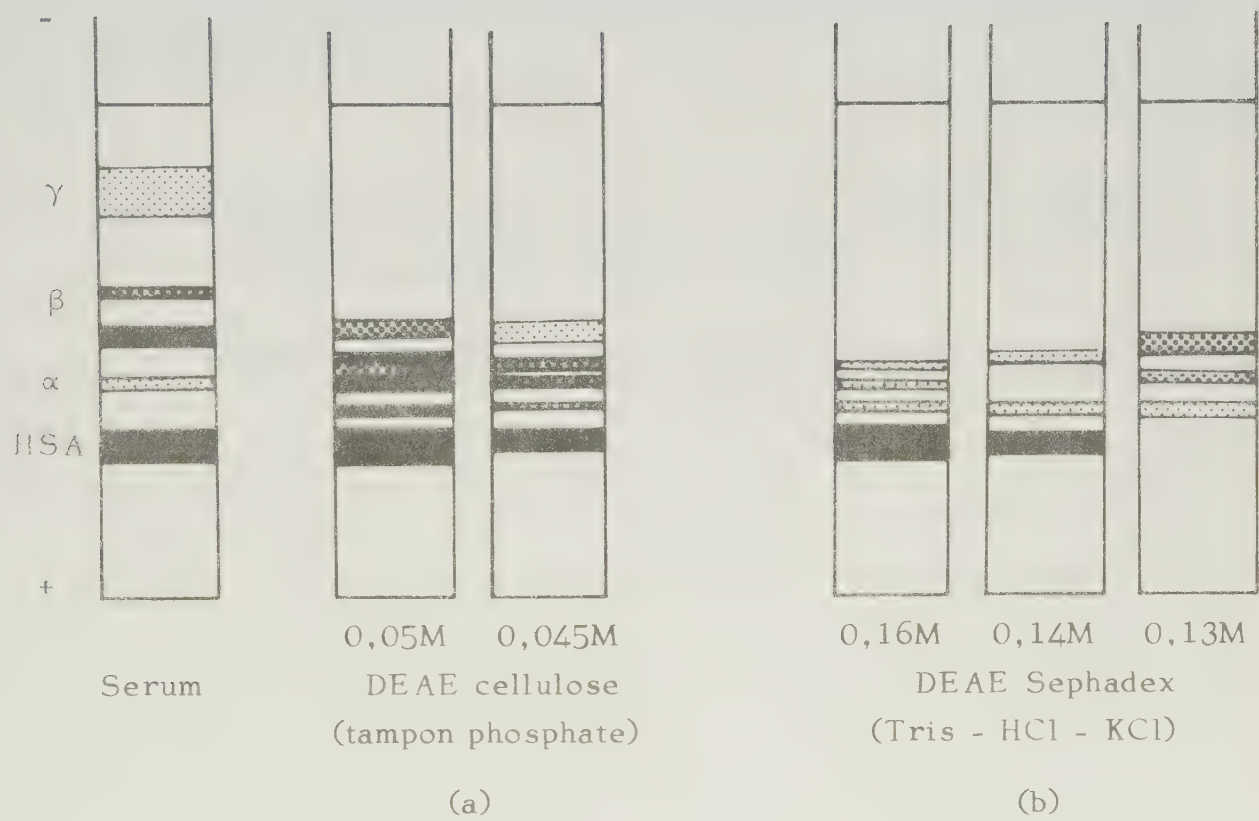
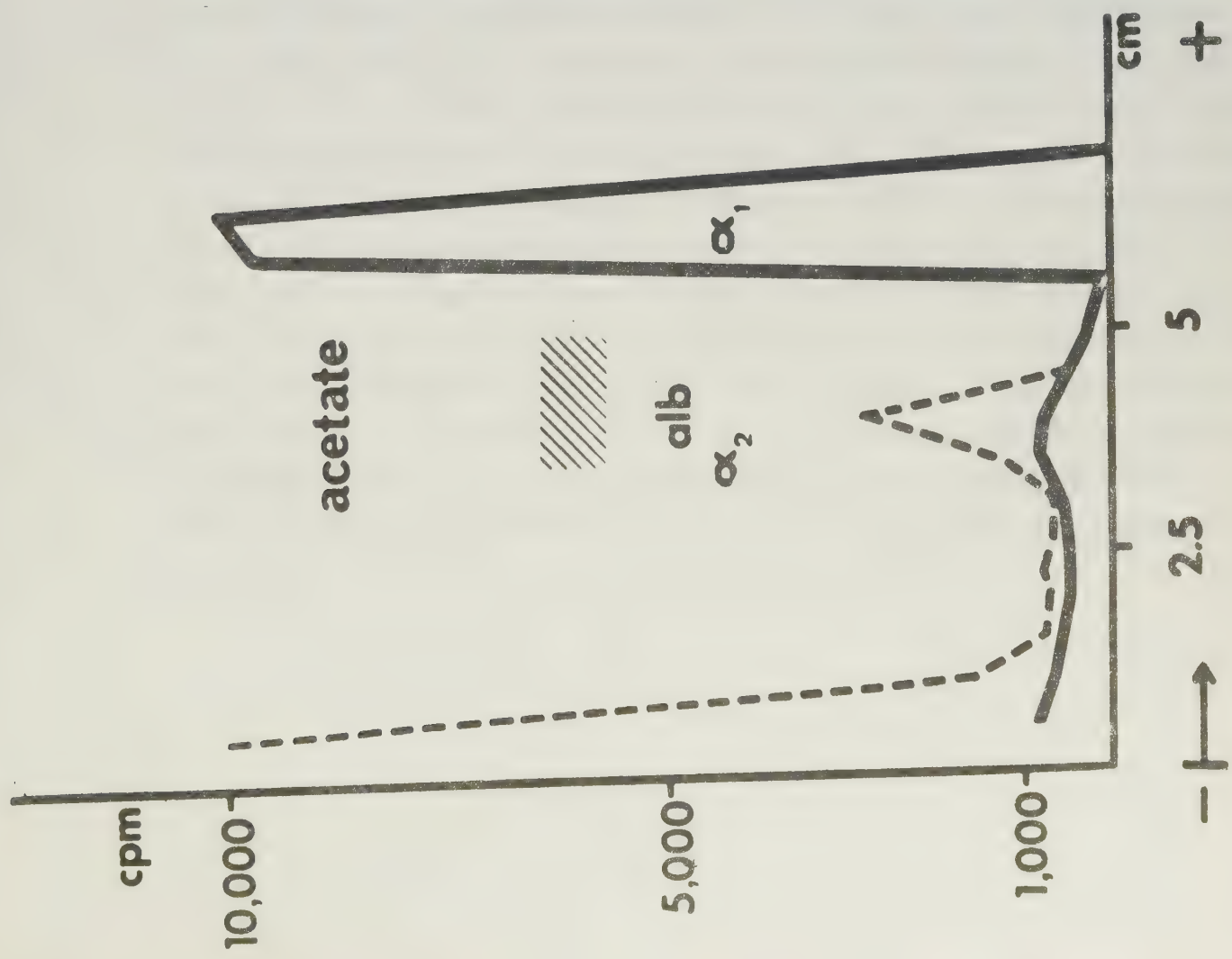
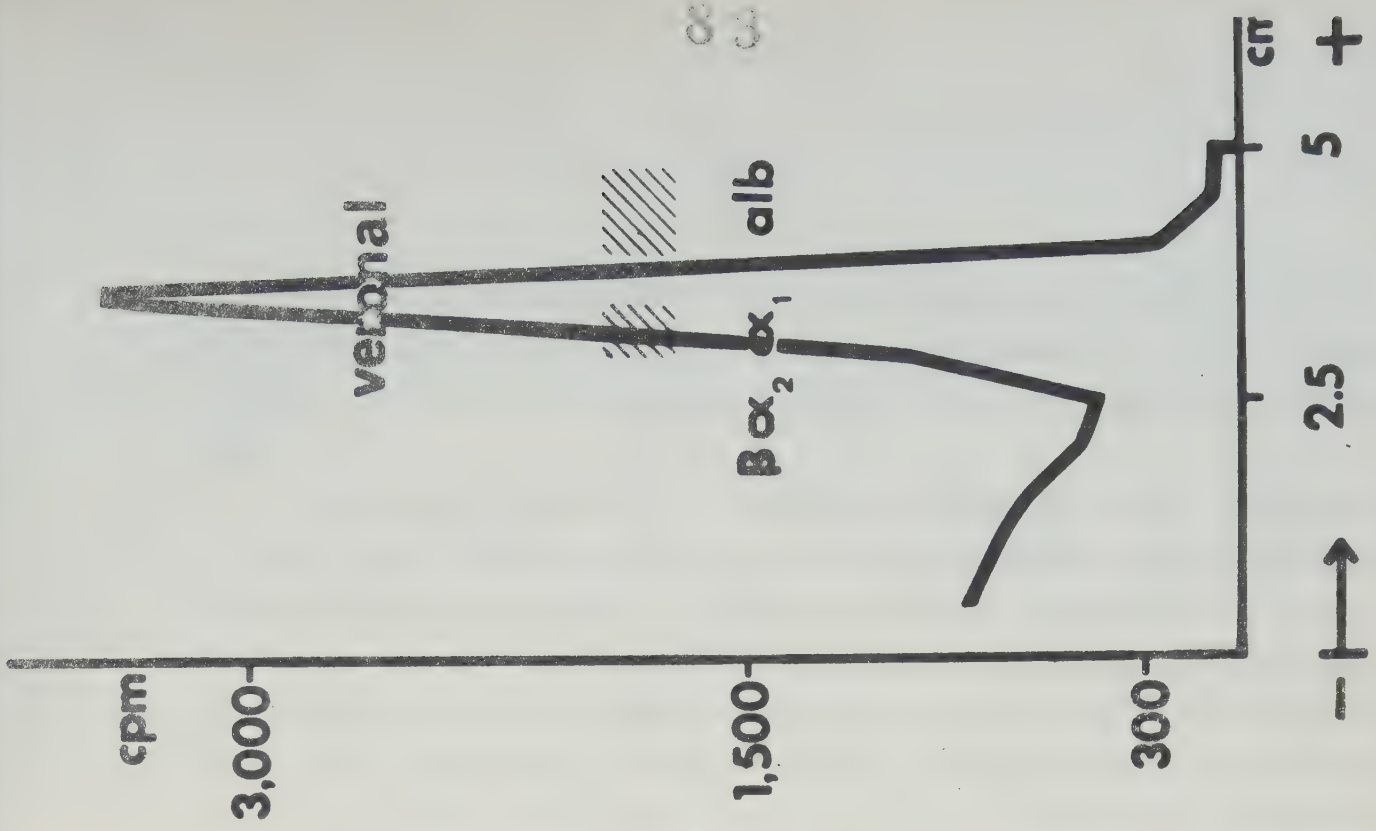


Figure 14

Electrophorèse de fractions partiellement purifiées
de transcortine.

— migration dans le tampon acétate ou véronal après
incubation avec du cortisol 10^{-8} M.

--- témoin de sérum albumine incubée avec du cortisol 10^{-8} M.



L'emploi de Sephadex G-200 s'est également révélé inutile à ce stade de la purification, car la transcortine (poids moléculaire 52000) et l'albumine (69000) ne se séparent pas sur ce gel.

Une grande partie de l'albumine contaminant les fractions actives après DEAE-cellulose a pu être éliminée par chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 dans du tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,6 contenant des quantités croissantes de KCl. La colonne est préparée dans du tampon contenant 0,009 M KCl, la préparation (équilibrée dans le même tampon) déposée après incubation avec de la corticostérone tritiée, et la transcortine, repérée par sa liaison à la corticostérone, se trouve dans les éluats 0,13 M KCl (fig. 15), alors que l'albumine n'apparaît que dans le KCl 0,14 - 0,15 M. Les fractions les plus actives, qui en général ne contenaient plus d'albumine (fig. 13), ont été incubées de nouveau avec de la corticostérone tritiée et chromatographiées sur 10- 20 g d'hydroxyapatite dans du tampon 0,005 M, pH 6,8 (fig. 16). La transcortine et les stéroïdes libres migrent avec le front du solvant. La faible quantité de protéine purifiée obtenue après hydroxyapatite n'a jamais été détectable en électrophorèse, mais l'étude approfondie de la liaison par la méthode de Baulieu et Raynaud (12 , et voir Techniques D,7,b) a montré que cette fraction était pure au point de vue liaison (courbe de type S, fig. 17).

Figure 15

Purification de la transcortine incubée avec de la corticostérone 1,2-H³ sur DEAE Sephadex, fractions de 5 ml.

DO 280 mμ —

DEAE-SEPHADEX A-50

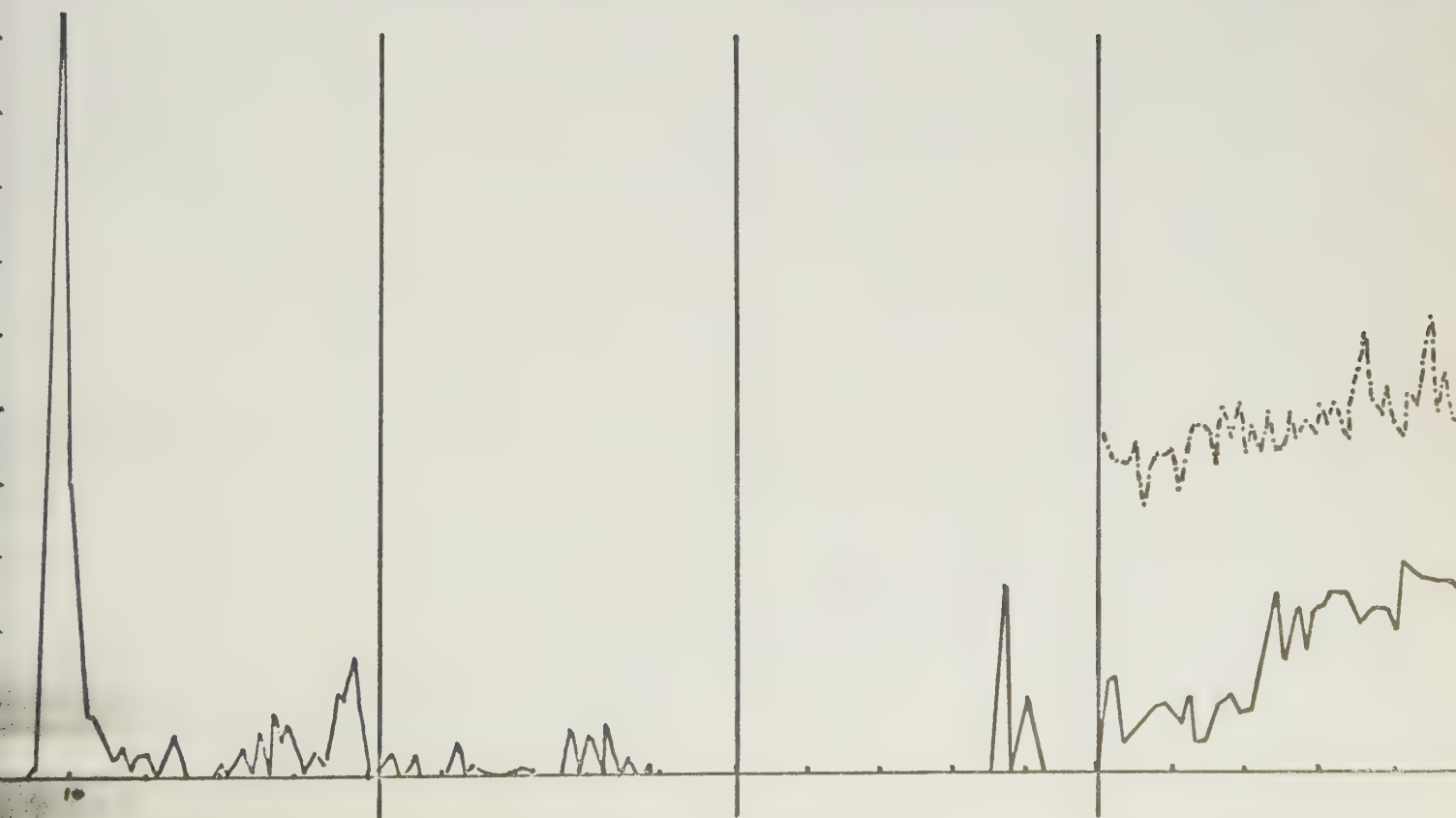
TRIS-HCl + Molarités croissantes de KCl

0,03 M

0,11 M

0,12 M

0,125 M



--- CPM

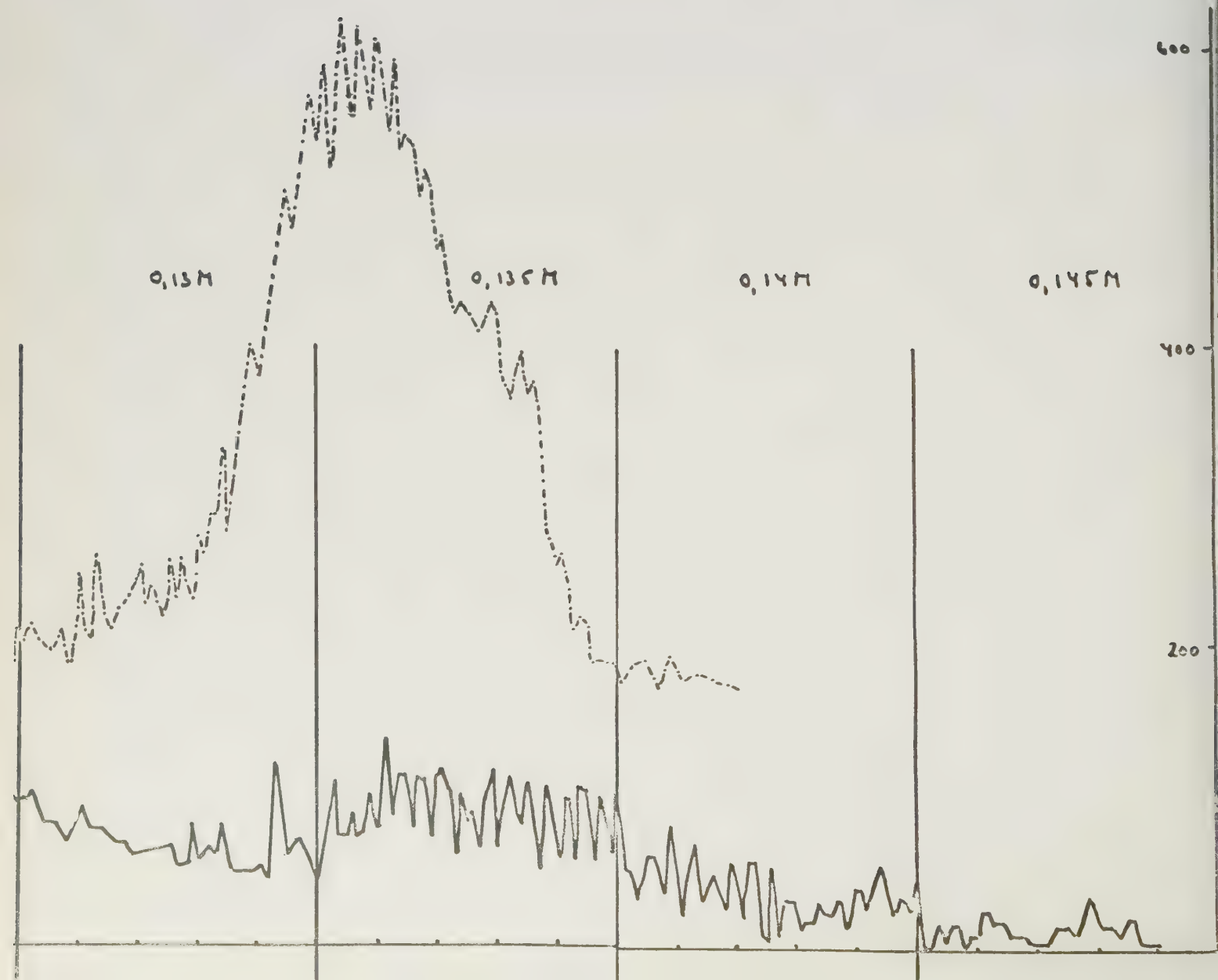


Figure 16

Purification de la transcortine incubée avec de
la corticostérone 1,2-H³ sur Hydroxyapatite, fractions
de 2 ml.

HYDROXYAPATITE

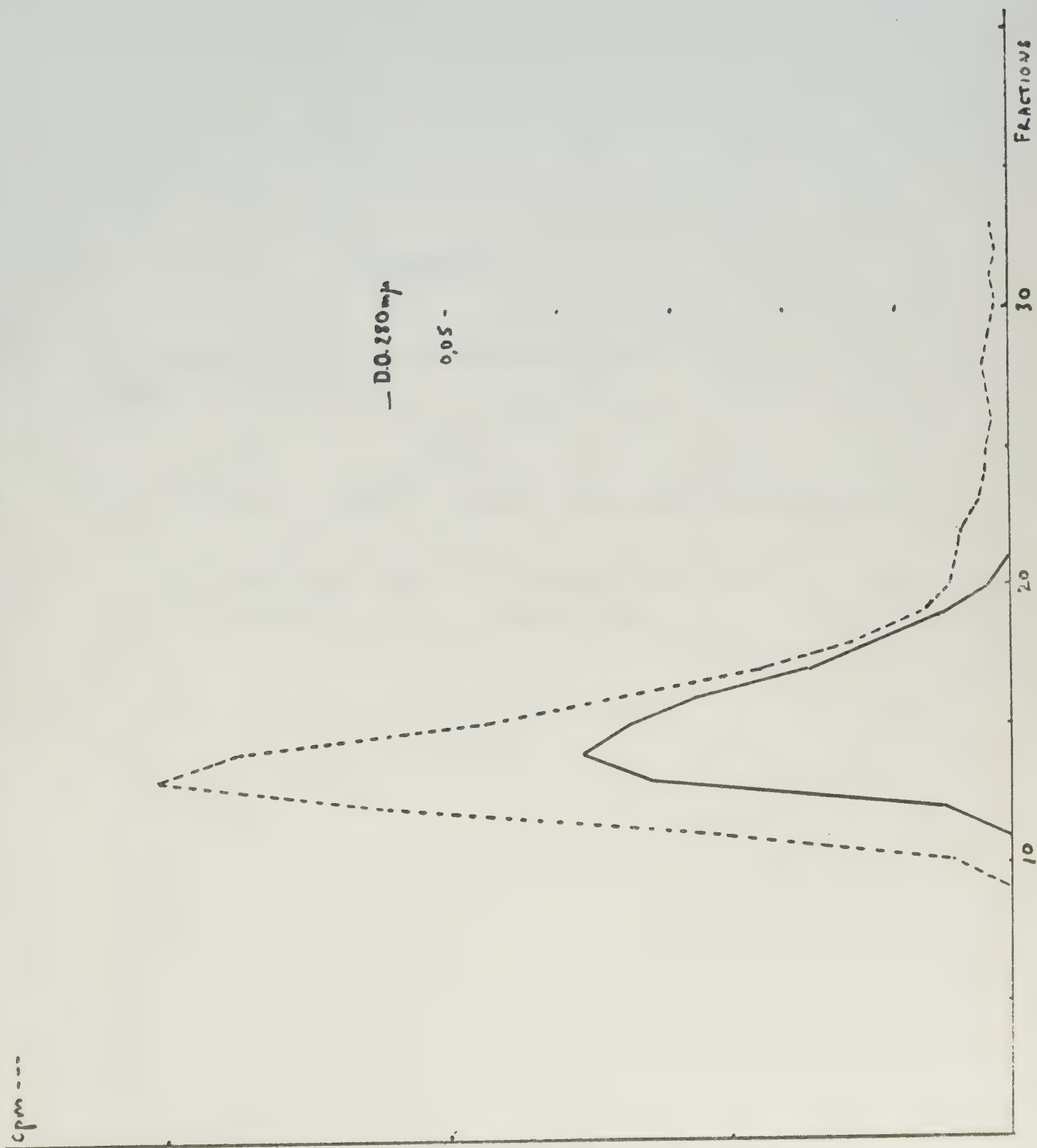
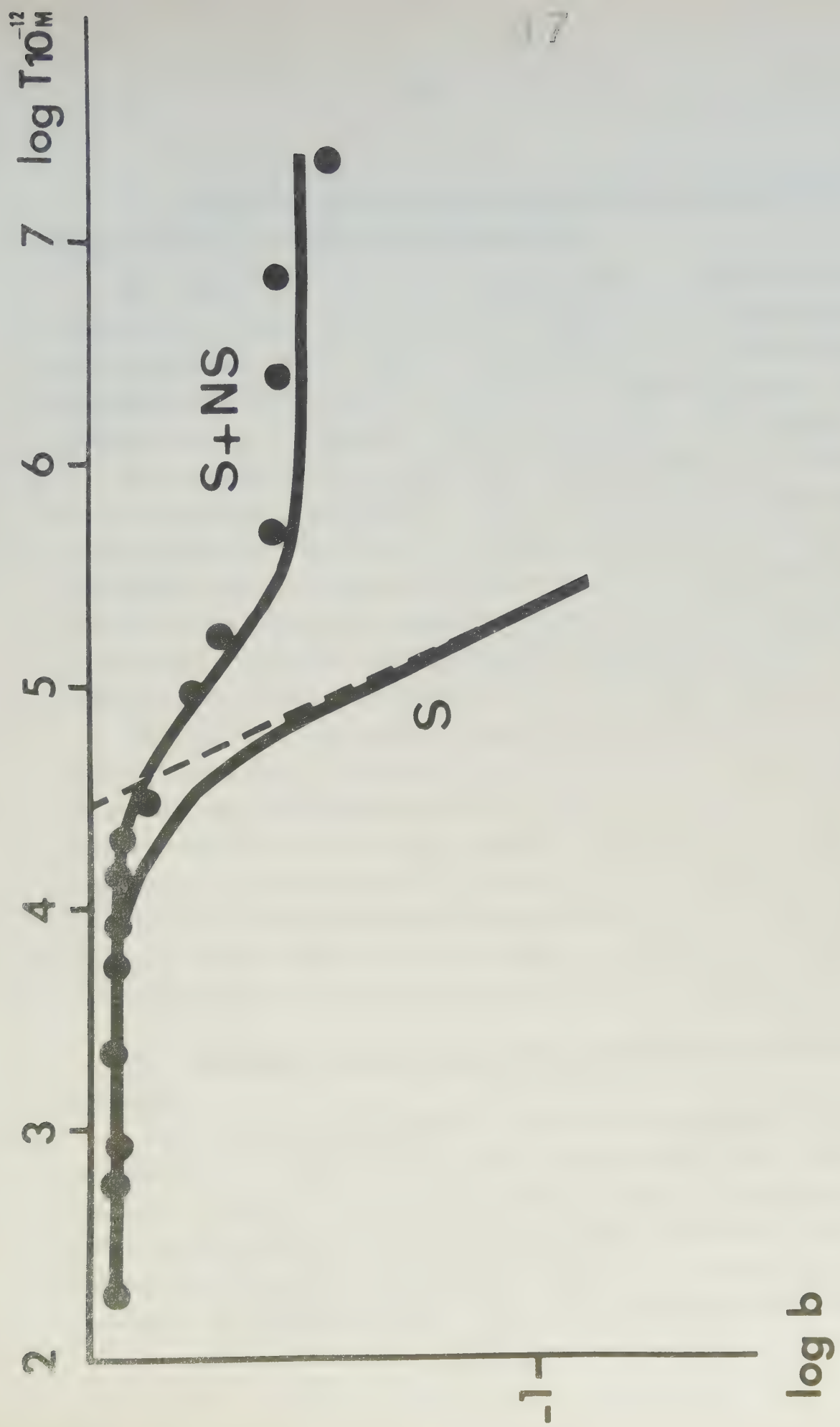


Figure 17

Liaison de la corticostérone 1,2-H³ à la fraction IV de Cohn.

S + NS : courbe établie d'après les points expérimentaux.

S : composante due à la liaison spécifique de la corticostérone à la transcortine.



C - Liaison du sulfate de corticostérone à une préparation partiellement purifiée de transcortine.

La compétition entre une quantité fixe de corticostérone radioactive et des concentrations variables de compétiteurs non radioactifs a été étudiée par dialyse à l'équilibre sur des préparations partiellement purifiées sur DEAE-cellulose, qui contenaient de la transcortine et passablement d'albumine.

Les résultats sont représentés graphiquement en pourcentage de corticostérone radioactive liée, en fonction du logarithme de la concentration totale de compétiteur (fig. 18) (75). Le déplacement de la courbe de liaison vers la droite donne une indication de l'affinité du compétiteur pour les sites de liaison de la corticostérone, mais ce type d'expérience ne permet pas de calculer les constantes d'association des compétiteurs.

On voit que par ordre d'affinité décroissante on trouvait la corticostérone, le sulfate de corticostérone, la testostérone et le sulfate de testostérone. Le sulfate de déhydroépiandrostérone ne déplaçait pas du tout la corticostérone. Les sulfates des hormones Δ^4 , 3-cétoniques se liaient à la transcortine, mais avec une affinité plus faible que les hormones libres correspondantes ; le groupement sulfate diminuait donc la liaison mais n'empêchait pas l'accès du stéroïde aux sites de fixation de la transcortine.

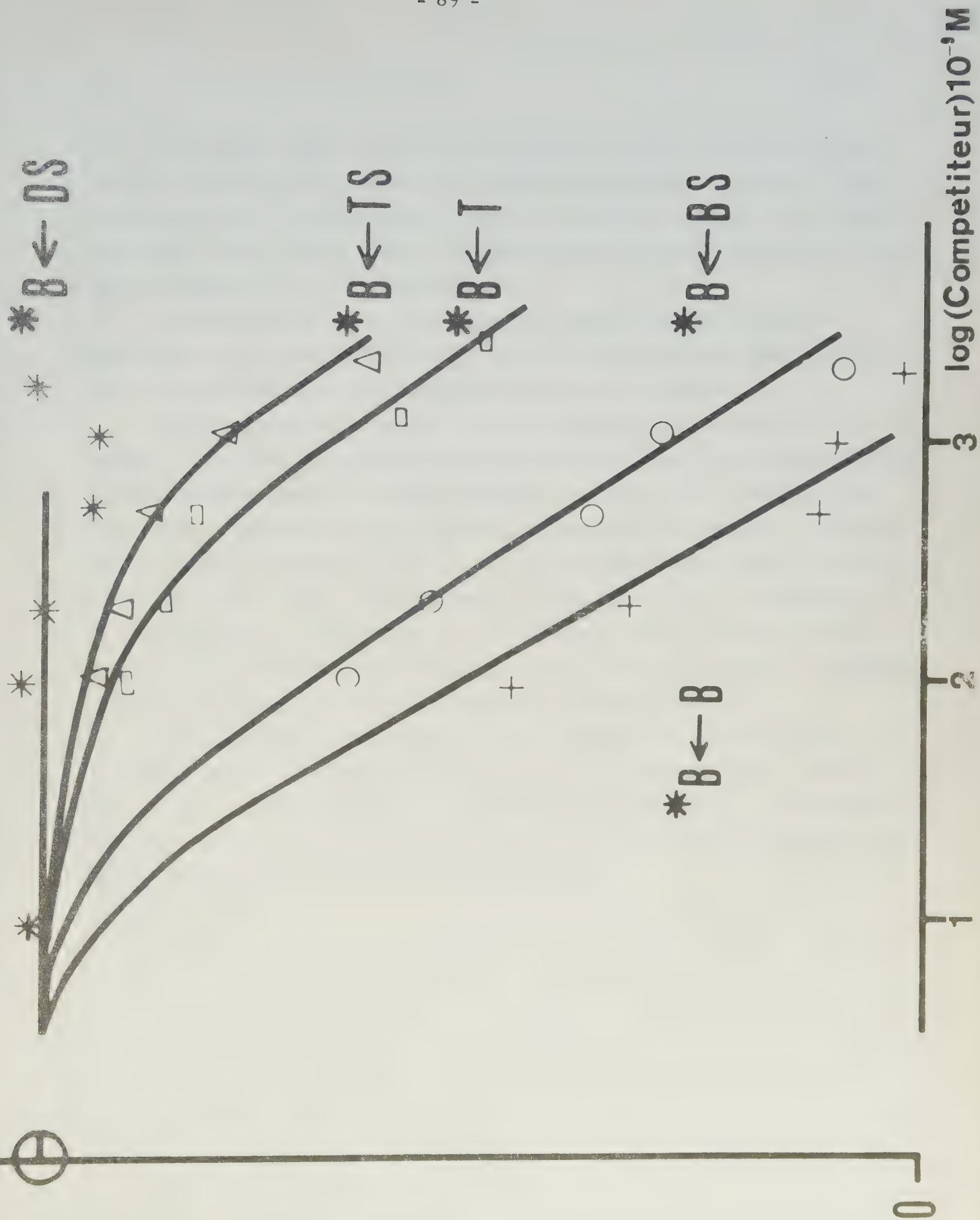
D - Liaison du sulfate de corticostérone à la transcortine purifiée.

Pour mesurer la constante d'affinité du sulfate de corticostérone pour la transcortine, des fractions purifiées environ 200 fois à partir du plasma (calculé d'après la concentration en sites de transcortine) ont été employées. Les mesures ont été faites par dialyse à l'équilibre, avec une concentration fixe de protéine, et au moins 10 concentrations différentes de ligand

Figure 18

Liaison de la corticostérone 1,2-H³ à des fractions partiellement purifiées de transcortine en présence de compétiteurs non radioactifs.

- B : corticostérone
- BS : sulfate de corticostérone
- T : testostérone
- TS : sulfate de testostérone
- DS : sulfate de déhydroépiandrosterone



par expérience. Des expériences faites à deux concentrations de transcortine provenant de la même préparation montrent que la constante d'affinité (K_S) reste constante, et que le nombre de sites (Nm_S) varie dans le même rapport que les concentrations de protéines (fig. 19, tableau X).

Les résultats sont représentés graphiquement selon la méthode de Baulieu et Raynaud (12), et les valeurs des paramètres de liaison ont été déterminées par ordinateur.

La constante d'affinité de la corticostérone a été déterminée, puis celle du sulfate de corticostérone a été mesurée par la méthode "directe" et par compétition (fig. 20, tableau XI). Les valeurs obtenues par ces deux méthodes concordent : le sulfate de corticostérone est lié à la transcortine avec une affinité deux fois plus faible que la corticostérone. Le nombre de sites occupés à saturation de la protéine est le même pour les deux ligands, donc il est probable que ces deux types de composés entrent en compétition pour les mêmes sites.

Un contrôle a été effectué en comparant les constantes d'affinité de la corticostérone et de la progestérone, déterminées de la même façon. Les valeurs trouvées à 4° C (corticostérone : $0,6 \times 10^9 M^{-1}$, progestérone : $0,4 \times 10^9 M^{-1}$) sont celles de la littérature (96,99) (tableau XI).

Figure 19.

Liaison de la corticostérone 1,2-H³ à la trans-cortine (CBG), à deux concentrations différentes de protéine.

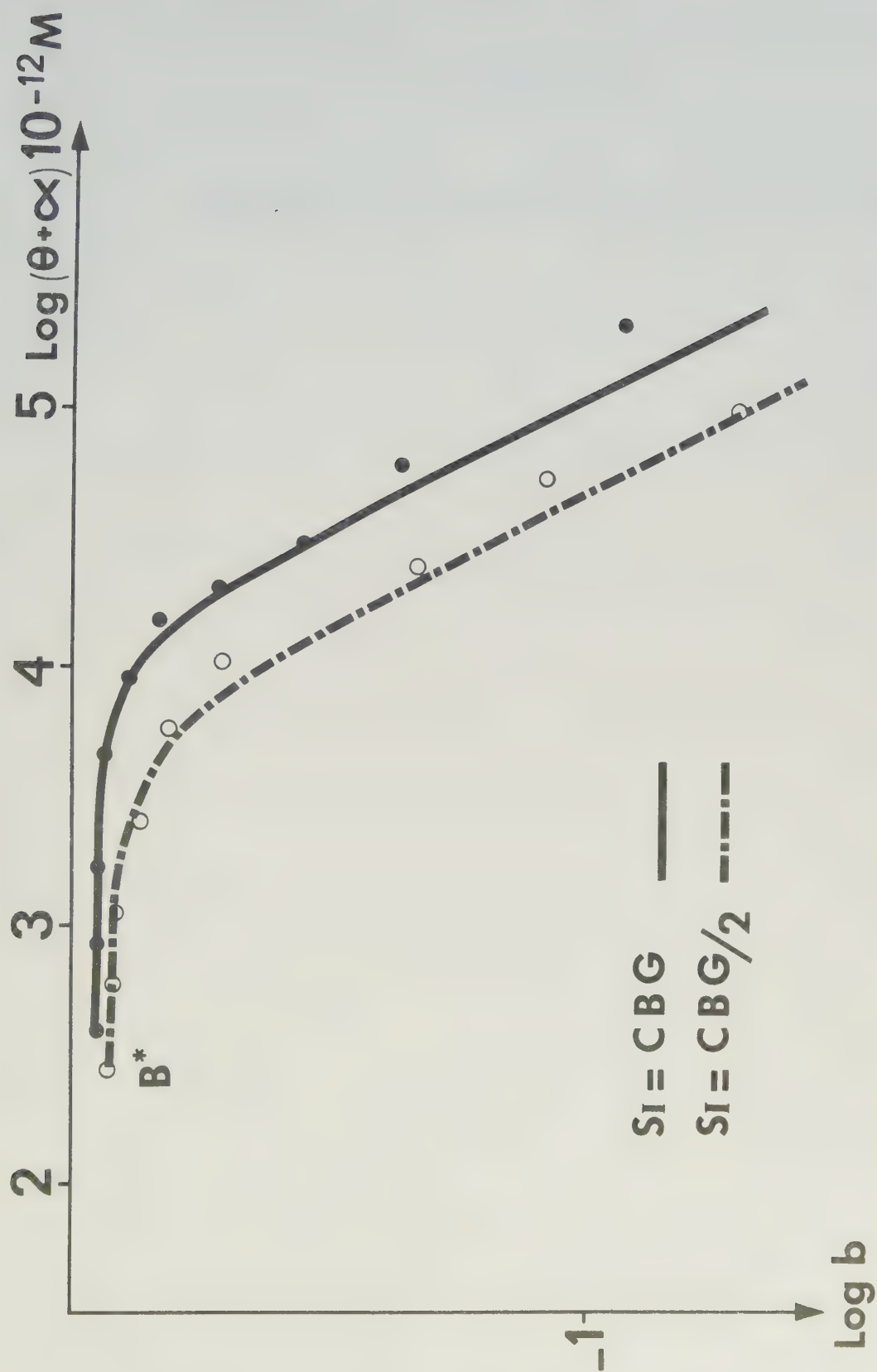


Tableau X

Liaison de la corticostérone à la transcortine

	K_S°	$Nm_S^{\circ\circ}$
Dilution 1	$0,8 \pm 0,1$	$11,0 \pm 1,0$
Dilution 1/2	$1,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,5$

$^{\circ} 10^9 M^{-1}$

$^{\circ\circ} 10^{-9} M$

Figure 20

Liaison de la corticostérone 1,2- H^3 et du sulfate de corticostérone à la transcortine.

Les constantes d'affinité K sont celles obtenues avec la corticostérone radioactive (B^*), avec le sulfate de corticostérone utilisé comme compétiteur ($BS_1 = 5 \text{ m}\mu\text{M}$; $BS_2 = 20 \text{ m}\mu\text{M}$), et directement avec le sulfate de corticostérone radioactif (B^*S).

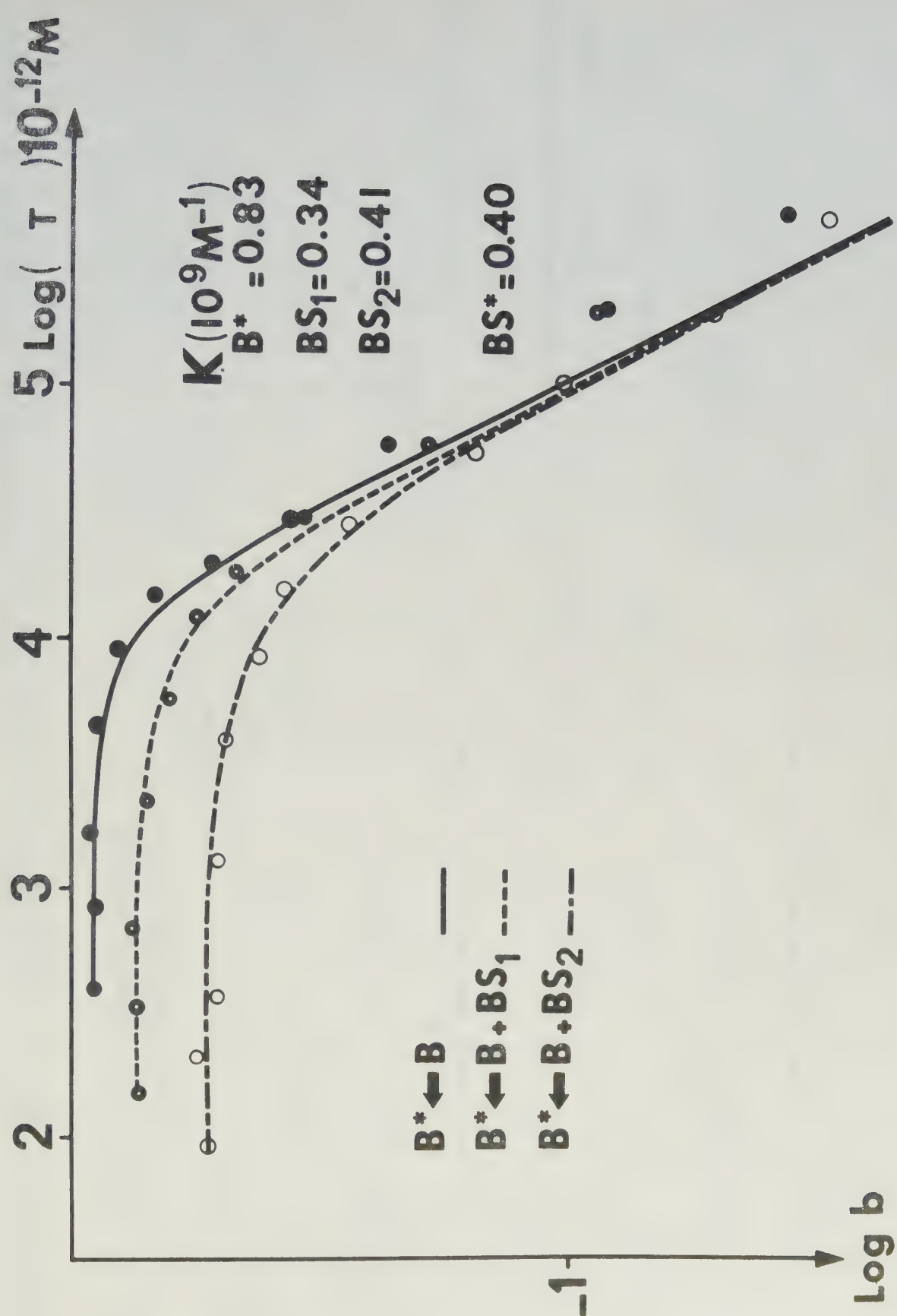


Tableau XI

Liaison de la corticostérone, sulfate de corticostérone et progestérone à la Transcortine purifiée.

Stéroïde lié	Méthode d'étude de la liaison	K_S ($10^9 M^{-1}$)	K_C ($10^9 M^{-1}$)	N_S ($10^{-9} M$)	F (K cal/mole)
a) Corticostérone	directe	$0,83 \pm 0,07$		$11,0 \pm 0,8$	- 11,4
Sulfate de corticostérone	directe	$0,40 \pm 0,06$		12 ± 1	- 7,6
Corticostérone en présence de sulfate de corticostérone	compétition		$0,34 \pm 0,08^{(1)}$ $0,41 \pm 0,09^{(2)}$	11 ± 1 11 ± 1	
(1) S - B = $5 \times 10^{-9} M$					
(2) S - B = $20 \times 10^{-9} M$					
b) Corticostérone	directe	$0,63 \pm 0,07$		$10,0 \pm 0,8$	- 10,1
Progestérone	directe	$0,40 \pm 0,05$		$10,0 \pm 0,8$	- 7,6
Corticostérone en présence de progestérone	compétition		$0,48 \pm 0,09^{(1)}$ $0,35 \pm 0,07^{(2)}$	$10,0 \pm 0,5$ 11 ± 1	
(1) P = $5 \times 10^{-9} M$					
(2) P = $20 \times 10^{-9} M$					

Conclusion

Nous avons démontré que le sulfate de corticostérone peut se lier à la transcortine, avec une affinité moins grande que l'hormone libre correspondante, mais plus grande qu'un autre stéroïde libre tel que la testostérone. Par contre, le sulfate de déhydroépiandrosterone (3β hydroxyle $\Delta 5$) n'est pas lié ; la fonction $\Delta 4$, 3-cétonique du noyau A étant indispensable pour une liaison à la transcortine (29, 96), il est donc évident que la moitié sulfate de la molécule n'y participe pas. Il est intéressant de voir que le sulfate de corticostérone est davantage lié que la testostérone ; cela semble montrer qu'une chaîne latérale polaire en 17β favorise l'attachement du ligand à la transcortine, et que le sulfate n'empêche pas l'accès du ligand à son site de liaison. Cela peut donner une indication sur la conformation du site.

Il semble aussi que des hormones sulfoconjuguées peuvent entrer en compétition avec les hormones libres pour les sites de liaison de certaines protéines plasmatiques. Elles pourraient ainsi, en déplaçant l'hormone libre et la rendant disponible et active (96), exercer une régulation sur l'activité hormonale. Cette hypothèse est séduisante, mais ne paraît pas actuellement pouvoir s'appliquer à d'autres protéines plasmatiques, puisque Christine Mercier-Bodard, dans notre laboratoire, a démontré que la protéine plasmatique liant spécifiquement la testostérone et l'oestradiol (SBP) ne liait pas leurs sulfates.

CONCLUSION GENERALE

Cherchant à mieux comprendre le métabolisme des stéroïdes sulfoconjugués, nous avons démontré dans des expériences in vitro que des précurseurs des hormones surrénaliennes peuvent être sulfoconjugués et métabolisés sans hydrolyse du sulfate par les enzymes de la surrénale. Quantitativement ces réactions sont défavorisées, et s'il existe une "voie de biosynthèse" des stéroïdes sulfoconjugués comme nous en avons fait l'hypothèse, celle-ci ne peut être que mineure chez l'homme adulte normal. Elle pourrait prendre de l'importance dans certaines circonstances telles que la naissance, mais nous n'avons pas pu le démontrer chez le rat.

Une expérience globale a été réalisée, où nous avons injecté du cholestérol- C^{14} et du sulfate de cholestérol- H^3 à un homme normal pour étudier leur contribution respective à la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens. Il a été démontré que le sulfate de cholestérol ne contribue pas de manière privilégiée à la synthèse des stéroïdes sulfoconjugués, mais qu'il est au contraire, en équilibre avec le cholestérol libre, puisque tous les métabolites urinaires glucuro ou sulfoconjugués étudiés avaient le même rapport H^3/C^{14} et la même activité spécifique. Il y a probablement, in vivo, une interconversion très importante des composés libres et sulfoconjugués à la périphérie et à toutes les étapes de leur biosynthèse.

Le sulfate de cholestérol a été mis en évidence dans le plasma, et le sulfate de corticostérone dosé dans l'urine, le tissu surrénalien et le plasma.

La quantité de sulfate de corticostérone isolée dans le tissu surrénalien était nettement plus importante que celle trouvée dans le sang périphérique. Ceci indique soit une sécrétion

de sulfate de corticostérone, soit une concentration du sulfate circulant par la glande surrénale. Nous avons déjà émis l'hypothèse d'une sécrétion surrénalienne du sulfate de corticostérone lors d'une expérience où les métabolites urinaires de la corticostérone avaient été isolés après une injection intraveineuse de corticostérone tritiée à un homme normal ; les résultats montraient que les métabolites provenant de la corticostérone sulfoconjuguée avaient des activités spécifiques beaucoup plus faibles que ceux de la corticostérone libre, suggérant une "dilution" des premiers par un composé endogène qui serait éliminé comme le sulfate de corticostérone. Le composé endogène pouvait être le sulfate de corticostérone lui-même, et c'est ce que nous avons cherché à démontrer ici. D'autre part, le taux de production du sulfate de corticostérone mesuré d'après la demi-vie et la concentration de ce sulfate dans le sang, est plus élevé que les valeurs publiées par d'autres auteurs, mais va dans le sens des résultats précédents où le taux de production avait été calculé, après injection de sulfate- S^{35} de corticostérone- H^3 , d'après l'activité spécifique des métabolites urinaires de ce composé.

La demi-vie du sulfate de corticostérone dans le plasma a été mesurée et s'est révélée presque égale à celle de la corticostérone libre et très différente de celle du sulfate de déhydroépiandrosterone. La protection contre le métabolisme hépatique, observée pour le sulfate de déhydroépiandrosterone, qui semble due à la sulfoconjugaison de la molécule et qui lui confère une longue demi-vie dans le sang, ne semble pas s'appliquer à tous les stéroïdes sulfoconjugués. Cette différence entre les deux sulfates pourrait s'expliquer par un mode de liaison différent aux protéines plasmatiques.

A l'exception du sulfate de déhydroépiandrostérone et du sulfate d'androstérone, les stéroïdes sulfoconjugués circulent en faible quantité dans le sang, et la régulation du taux d'hormones actives disponibles à chaque instant ne semble pas, comme on avait pu le penser, provenir d'une lente hydrolyse de stéroïdes sulfoconjugués inactifs, sécrétés en grande quantité et servant de "réservoir". Il a fallu trouver une autre explication du rôle physiologique des stéroïdes sulfoconjugués, en supposant par exemple une action au niveau des sites de liaison des protéines plasmatiques.

La possibilité d'une liaison des hormones sulfoconjuguées aux sites des protéines plasmatiques qui transportent spécifiquement les hormones a été étudiée. Nous avons démontré que, en effet, sur une protéine telle que la transcortine, les sulfates d'hormones portant sur leur noyau A la fonction $\Delta 4,3$ -cétonique indispensable à la liaison, étaient liés, et entraient en compétition avec l'hormone libre pour ses sites de liaison.

Les hormones sulfoconjuguées peuvent ainsi, en déplaçant les hormones libres du complexe inactif qu'elles forment avec leur protéine de transport, exercer une régulation sur la quantité d'hormone active circulante. Par cette action, ainsi que par une fonction inhibitrice au niveau des enzymes du métabolisme stéroïdien, les sulfoconjugués, même présents en faible quantité dans les tissus, pourraient jouer un rôle dans le maintien de l'équilibre hormonal, et leur existence ne s'expliquerait pas uniquement par l'excrétion des déchets du métabolisme.

D'autre part, le rôle du sulfate de cholestérol reste mystérieux. Alors qu'il en existe dans presque tous les tissus, il ne semble participer que faiblement à la synthèse des stéroïdes. Cela peut être dû à une mauvaise pénétration dans les

cellules, puisqu'il est métabolisé par les enzymes isolés, mais ce manque de réactivité est encore accentué du fait que les enzymes métabolisent le sulfate de cholestérol plus lentement que le cholestérol libre. Le sulfate de cholestérol pourrait jouer un rôle dans la membrane cellulaire ou mitochondriale, puisqu'il possède à la fois la structure lipophile du cholestérol et un caractère anionique dû au sulfate. Ce genre de composé bipolaire pourrait trouver sa place dans la structure membranaire, à la fois comme le cholestérol en apportant sa rigidité, et comme les phospholipides par sa charge électrique. Aucune recherche n'a encore été entreprise dans cette direction.

Il faut donc reconnaître que malgré des recherches effectuées dans de nombreuses directions différentes, le problème du véritable rôle des stéroïdes sulfoconjugués n'est pas encore résolu.

On pensait qu'ils constituaient une voie de biosynthèse importante, parallèle à celle des stéroïdes libres, où chaque composé intermédiaire pourrait servir de réservoir inactif, capable à tout instant d'être hydrolysé en composé libre actif ; il s'est avéré que cette voie des sulfates existe, mais qu'elle est d'une faible importance quantitative.

On pensait que la sulfoconjugaison conférait à tous les stéroïdes le pouvoir d'échapper au catabolisme hépatique, et que grâce à leur longue demi-vie dans le sang, les sulfates seraient des "pro-hormones". Nous avons vu que le sulfate de corticostérone est éliminé du sang à la même vitesse que son homologue libre, et qu'il n'est pas protégé par sa sulfoconjugaison.

Enfin, nous avons vu que le rôle des sulfates n'est pas obligatoirement lié à un aspect quantitatif, mais que grâce à leur capacité d'occuper sur des protéines enzymatiques ou de transport, les sites spécifiques des hormones libres, ils peuvent même à faible concentration exercer une régulation sur le métabolisme et le taux d'hormone active circulante. C'est probablement dans cette direction que se poursuivront les recherches destinées à mieux comprendre ces mystérieux sulfates.

TECHNIQUES

A - Techniques employées pour l'étude du métabolisme des stéroïdes

1° - Solvants

La plupart des solvants ont été purifiés au laboratoire selon les méthodes classiques (49). Le t-butanol, l'alcool isoamylique, le toluène et l'acétone employés tels qu'ils étaient des produits Merck (pur pour chromatographie) et l'alcool absolu, le propanediol et la formamide étaient des produits R.P. Prolabo.

2° - Adsorbants pour chromatographie sur colonne

Céelite 535 (Johns-Manville) : lavée à l'acide chlorhydrique 50%, puis à l'eau et au méthanol, et séchée pendant plusieurs jours à 100° C.

Florisil : lavé plusieurs fois à l'alcool absolu, puis séché à 100° C et activé à 650° C avant l'emploi.

Alumine (Woelm, Grade I).

3° - Méthodes d'extraction des stéroïdes

a) Extraction des stéroïdes conjugués

Méthode à l'éther-éthanol selon Kellie (35)

Cette technique permet d'extraire avec un excellent rendement des stéroïdes neutres sulfo ou glucoroconjugués ou des stérols en solution dans l'eau, le plasma ou l'urine. Elle a l'inconvénient de donner un extrait chargé de sulfate d'ammonium dont il est très difficile de se débarrasser.

La solution contenant les stéroïdes est additionnée de 50 % poids/vol de sulfate d'ammonium, puis est extraite 3 fois par un volume égal d'éther-éthanol 3:1. Le solvant est évaporé presque

à sec et repris par l'éthanol absolu pour précipiter le sulfate d'ammonium entraîné. On filtre et répète l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de sulfate d'ammonium dans l'extrait. On met alors à sec le filtrat.

Méthode de McKenna et Norymberski (67)

Les sulfates qui en général sont plus solubles dans l'eau que dans les solvants non polaires, deviennent solubles dans le chloroforme lorsqu'ils sont couplés à l'ion pyridinium. On traite donc les sulfates en phase aqueuse à pH 7 par un volume de sulfate de pyridinium 0,3 M. On extrait ensuite trois fois par quatre volumes de chloroforme. Le chloroforme contient les stéroïdes neutres et sulfoconjugués. On le lave par la soude N ce qui entraîne les sulfates transformés en sels de sodium, et les stéroïdes libres restent dans le chloroforme. On acidifie la phase aqueuse pour la ramener à pH 7, on ajoute un volume égal de sulfate de pyridinium et on extrait de nouveau par le chloroforme. On obtient alors un extrait ne contenant que les sulfates. Malheureusement cette séparation n'est pas quantitative et nous avons surtout employé cette méthode pour l'extraction des stéroïdes, préférant séparer les stéroïdes libres et conjugués par chromatographie sur colonne.

b) Extraction des stéroïdes conjugués urinaires suivie d'hydrolyse séquentielle de sulfo et glucuroconjugués (Baulieu, Michaud)(7,49).

Les urines sont premièrement soumises à 3 extractions d'1 heure par un volume égal de dichlorométhane : Les stéroïdes libres passent dans la phase organique. On amène alors la phase aqueuse à pH 1 par l'acide sulfurique, on ajoute 20 % de NaCl et on extrait 3 fois v/v par l'acétate d'éthyle. La phase organique est incubée pendant une nuit à 37°, et pendant ce temps les sulfates sont hydrolysés. L'acétate d'éthyle est alors lavé par la soude N et l'eau et les stéroïdes qui étaient sulfoconjugués

restent dans l'acétate d'éthyle alors que les glucuroconjugués restent dans la phase aqueuse. Celle-ci est amenée à pH 5 par l'acide acétique puis on ajoute 10 % du volume de tampon acétate pH 5 (3p. acide acétique 120 ml/l et 7p. acétate de sodium 272 gr/l) et 1 % de suc d'Helix Pomatia L contenant de la β -glucuronidase et des traces de sulfatase. On laisse 24 heures à 37°, on ajoute de nouveau 0,5 % de suc d'Helix Pomatia, on incube encore 24 heures, puis on extrait 3 fois une heure par un volume égal de dichlorométhane. On lave le dichlorométhane par la soude N et l'eau, puis on l'évapore. Le résidu contient les stéroïdes qui étaient glucuroconjugués.

4° - Hydrolyse des sulfoconjugués

a) Hydrolyse enzymatique (48)

100 mg de sulfate de stéroïde sont dissous dans 1 ml de tampon acéto-acétique 0,1 M, pH 4,5. On ajoute 0,04 ml d'une sulfatase purifiée d'Helix Pomatia L (1800000 U Roy/ml). La préparation est maintenue à 37° pendant 24 heures puis extraite par le dichlorométhane qui est lavé à l'eau, séché sur sulfate de sodium anhydre et mis à sec.

b) Solvolyse (16)

Les sulfates sont mis en solution dans 20 ml d'eau, on amène à pH 1 par de l'acide sulfurique, puis on ajoute 20 % de chlorure de sodium. On extrait 3 fois 1 heure par un volume égal d'acétate d'éthyle et la phase organique est incubée à 37° pendant une nuit. Le lendemain l'acétate d'éthyle est lavé par la soude N puis par de l'eau et la phase organique qui contient les stéroïdes solvolysés est mise à sec.

5° - Partage benzène/eau selon Talbot (49)

Cette technique permet de séparer grossièrement les stéroïdes peu polaires de ceux contenant au moins 3 hydroxyles. L'extrait est dissous dans 0,1 ml de méthanol et 10 ml de benzène, puis

extrait par 10 fois 10 ml d'eau. Les composés peu polaires restent dans le benzène et la plus grande partie des composés polyhydroxylés passent dans l'eau. On extrait l'eau par le dichlorométhane pour récupérer les stéroïdes.

6° - Séparation des stéroïdes cétoniques et alcooliques selon Girard (49).

Tous les stéroïdes cétoniques forment avec le réactif T de Girard (chlorure de triméthylacéthhydrazide d'ammonium) des composés insolubles dans les solvants organiques non hydroxylés et hydrosolubles à température ordinaire et à pH 6.

Pour des extraits de 10-200 mg de stéroïde, on ajoute à l'extrait sec : 40 ml éthanol absolu

5 ml acide acétique glacial

5 gr réactif T

On laisse ce mélange dans un récipient bien bouché pendant une nuit à 37°C, puis on ajoute 400 ml d'eau glacée et on amène le pH à 6,5 par la soude. On extrait par le dichlorométhane glacé. Le dichlorométhane contient les composés non cétoniques et l'eau les composés cétoniques liés au réactif T. On amène la phase aqueuse à pH 1 et procède à une extraction continue par le dichlorométhane pendant la nuit, ce qui hydrolyse le complexe et fait passer les stéroïdes cétoniques dans le dichlorométhane.

7° - Réduction des cétones par le borohydrure de sodium

Cette réaction permet de réduire les cétones en hydroxyles. Pour des doses traceuses de stéroïde, on met ce composé en solution dans 0,5 ml de méthanol et on ajoute 0,02 ml d'une solution de borohydrure de sodium (NaBH_4 : 10 mg/0,5 ml d'eau). On agite pendant 20 secondes, puis on ajoute 3 gouttes d'acide acétique et au minimum 2 ml d'eau. On extrait par 20 ml de dichlorométhane et on lave celui-ci par 2 fois 2 ml d'eau. On sèche le dichlorométhane sur du sulfate de sodium anhydre et on met à sec.

8° - Acétylation

La plupart des hydroxyles secondaires (sauf en cas d'empêchement stérique, par exemple en 11 β) des stéroïdes sont aisément acétylables par l'anhydride acétique en présence de pyridine. On dissout le stéroïde dans 0,5 - 1 ml de pyridine, on ajoute une quantité égale d'anhydride acétique et on laisse reposer dans un flacon bien bouché pendant une nuit à température ordinaire et à l'abri de l'humidité. On évapore ensuite les solvants et on traite plusieurs fois par le benzène, que l'on évapore pour entraîner tout l'anhydride acétique en excès et la pyridine. Les acétates sont alors purifiés sur colonne dans le système D ou F et sur papier dans le système 1.

9° - Chromatographie sur colonne

a) Chromatographie d'adsorption

Colonne de Florisil (6).

Le Florisil préalablement activé à 650° C est versé en pluie dans une colonne de verre remplie de benzène. L'extrait à purifier est dissous dans du benzène contenant 2 % de méthanol, et déposé sur la colonne. Les stéroïdes sont élués par des solvants de polarité croissante

benzène pur	élution des stéroïdes libres
acétone 1 - benzène 4	
acétone 1 - benzène 1	
acétone pure	élution des sulfoconjugués
acétone 50 - méthanol 1)	
acétone 20 - méthanol 1)	élution des sulfates
acétone 10 - méthanol 1)	polaires et des disulfates
acétone 1 - méthanol 1	élution des glucuronides
méthanol pur	

Colonne de silice-célite (49)

Un mélange de 2 g de silice et 0,5 g de célite est versé dans une colonne de 10 cm de haut et 1 cm de diamètre. Les stéroïdes sont élués par le benzène ou le dichlorométhane contenant des concentrations croissantes d'acétate d'éthyle. Ces petites colonnes permettent d'obtenir des séparations grossières entre des stéroïdes de polarités très différentes, et nous nous en sommes servi surtout pour débarrasser les éluats de chromatographie sur papier des impuretés dues aux solvants et au papier.

Colonne d'alumine (59)

L'alumine est hydratée à 4 % pour la chromatographie des stéroïdes cétoniques et à 6 % pour les stéroïdes polyhydroxylés. Pour des extraits contenant 0,2 g de stéroïdes, des colonnes de 15 g d'alumine (15 cm de hauteur dans les colonnes de 1,5 cm de diamètre) sont préparées dans le benzène. L'extrait est déposé dans le benzène puis élué, au rythme de 60 gouttes/min, par 250 ml de benzène dans lequel coule, à 15 gouttes/min un mélange benzène-méthanol 4% pour les stéroïdes cétoniques et 6% pour les stéroïdes hydroxylés. La polarité du solvant d'élu-tion croit donc selon un gradient convexe et permet une excellente séparation.

b) Chromatographie de partage (43,83)

Colonne de célite

Pour obtenir une bonne séparation, la quantité de célite employée est d'environ 1 g par mg d'extrait à purifier. La célite est imprégnée (2:1 poids/volume) par la phase stationnaire du système de solvants puis est tassée à sec dans la colonne. Les stéroïdes, dissous dans 1/10 du volume de phase

stationnaire employé pour imprégner la célite, sont adsorbés sur 1/10 du poids total de célite et ajoutés à la célite déjà tassée. Le volume de rétention de la colonne est mesuré en déterminant la quantité de phase mobile du solvant nécessaire pour mouiller tout l'adsorbant, puis on ajoute le reste de la phase mobile. La meilleure chromatographie est obtenue lorsque les stéroïdes sont élués vers le 4ème-5ème volume de rétention, celui-ci étant fonction du coefficient de partage du stéroïde dans le système de solvants employé. L'emploi de système de solvants où la phase stationnaire est alcaline ou acide permet de séparer entre eux les sulfo et glucuro-conjugés.

Systèmes de solvants

Systèmes pour la chromatographie des stéroïdes neutres

A. isooctane	16	
acétate d'éthyle	6 (ou 8)	androstérone et étiocholanolone
méthanol	18	dans les 2ème-3ème volume
eau	2	de rétention
B. isooctane	240	
acétate d'éthyle	240	
méthanol	270	pour la corticostérone
eau	30	
C. isooctane	240	
acétate d'éthyle	240	pour les tétrahydrodérivés de
méthanol	270	la corticostérone
eau	250	
D. isooctane	4	
acétate d'éthyle	2	pour l'acétate de
méthanol	2	corticostérone
eau	1	
E. isooctane	150	pour la corticostérone
butanol	75	(ce système s'étant révélé moins
tertiaire		efficace que B a été abandonné)
eau	360	

F. isooctane	250	pour l'acétate de desoxycorticostérone
méthanol	200	
eau	50	

G. Elution selon un gradient linéaire (101).

Ce système permet de séparer sur une seule colonne un grand nombre de stéroïdes neutres de polarités différentes. L'éthylène glycol tient lieu de phase stationnaire, et les stéroïdes sont élués par de l'isooctane graduellement enrichi en acétate d'éthyle selon un gradient linéaire. Cette technique cumule les avantages de l'élution en gradient et la reproductibilité des colonnes de célite, où un stéroïde donné est toujours élué dans le même volume de rétention.

Systèmes pour la chromatographie des stéroïdes sulfoconjugués

H. isooctane	200	(ou 250 pour la chromatographie de sulfates peu polaires)
butanol tertiaire	500	
ammoniaque M	500	

I. isooctane	300
butanol tertiaire	150
ammoniaque M	250

10° - Chromatographie sur papier

Toutes les chromatographies ont été faites sur papier Whatman n° 1 à 24° C $\pm$ 1° et sur des bandes de 40 cm de long.

Systèmes pour les stéroïdes neutres (49)

1. hexane 1 - benzène 1 / propanediol
2. chloroforme / formamide
3. heptane / phénylcellosolve
4. ligroïne / propanediol
5. cyclohexane 1 - benzène 1 / propanediol
6. isooctane 50 / t-butanol 25 / eau 45 (E₂B de Eberlein-Bongiovanni)
7. acétate de butyle / propanediol -eau

Dans les systèmes 1-5 les stéroïdes sont déposés sur papier imprégné de phase stationnaire en solution à 50 % dans du méthanol ; dans 6 et 7 on dépose sur papier sec.

Systèmes pour les stéroïdes sulfoconjugués (49)

- 8. alcool isoamylique 55 / ammoniacque 27 / eau 18 (20)
- 9. isooctane 2 / oxyde d'isopropyle 5 / t-butanol 3 / ammoniacque 1 / eau 9 (7)
- 10. alcool isoamylique 35 / hexane 20 / ammoniacque 20 / eau 40 (26)
- 11. hexane 3 / benzène 5 / oxyde d'isopropyle 20 / t-butanol 13 / ammoniacque 4 / eau 36 (7)

Dans ces systèmes les stéroïdes sont déposés sur papier sec.

Révélation (49)

La révélation des chromatogrammes a été faite selon les techniques classiques avec le réactif de Zimmermann, le trichlorure d'antimoine, l'acide phosphomolybdique ou le bleu de tétrazolium.

11° - Chromatographie sur plaque

Les plaques de verre (5 x 20 cm) étaient enduites de silicagel (Kiesel gel G. Merck) à l'avance à l'aide d'un applicateur Pleuger-France SA, séchées à 120° C et conservées dans un dessiccateur (à l'abri de la lumière lorsque le support contenait du nitrate d'argent).

Système de solvants :

J. benzène 5 - acétate d'éthyle 1

Les taches étaient révélées par de l'aldéhyde anisique (0,25 ml en solution dans 25 ml d'acide acétique glacial contenant 0,5 ml d'acide sulfurique).

12° - Dosages

a) Dosage par l'anhydride acétique radioactif (82)

En acétylant un stéroïde par de l'anhydride acétique d'activité spécifique connue, on peut ensuite mesurer la radioactivité dans l'acétate de stéroïde et en déduire le poids de stéroïde acétylé. Le stéroïde est dissous dans 0,5 ml de pyridine absolument anhydre et on ajoute un volume égal d'anhydride acétique radioactif, en solution dans le benzène et fraîchement distillé (en effet ce composé est très instable et se décompose spontanément, même dans un tube scellé et à -20° C). On laisse réagir, à l'abri de l'humidité, pendant une nuit à température ordinaire. On procède ensuite comme pour une acétylation ordinaire. On acétyle simultanément pour mesurer l'activité spécifique du réactif, un stéroïde facile à doser par une méthode colorimétrique ou spectrophotométrique. Ici, la desoxycorticostérone a été employée comme témoin car elle est aisément dosable à 240 mμ. Les acétates sont chromatographiés sur colonne dans les systèmes D ou F, puis recristallisés jusqu'à activité spécifique constante en présence d'acétate de stéroïde de référence.

Lorsqu'on cherche à doser un stéroïde non radioactif dans un échantillon, on ajoute, en début d'expérience, un traceur radioactif qui permet de suivre la purification du stéroïde et de contrôler les pertes expérimentales. On acétyle par de l'anhydride acétique portant un autre isotope, et on calcule la quantité de stéroïde présent dans l'échantillon initial à partir des quantités des deux isotopes retrouvés lors de la dernière recristallisation :

$$\begin{array}{l} \text{stéroïde dans} \\ \text{échantillon} \end{array} = \frac{\begin{array}{l} \text{isotope de l'anhydride} \\ \text{acétique dans cristaux } (\mu\text{C}) \\ \hline \text{activité spécifique de} \\ \text{l'anhydride acétique } (\mu\text{C}/\mu\text{M}) \end{array}}{\begin{array}{l} \text{traceur incubé } (\mu\text{C}) \\ \hline \text{isotope du traceur dans} \\ \text{cristaux } (\mu\text{C}) \end{array}} \times$$

b) Micro dosage par la méthode de Zimmermann.

Ce dosage permet de mesurer avec précision 5-20 µg de 17-cétostéroïde grâce à la formation d'un dérivé coloré lorsqu'on fait réagir le stéroïde avec du métadinitrobenzène en milieu alcalin. Ce dérivé peut alors être dosé par colorimétrie. Le stéroïde est mis à sec dans un tube et repris dans 0,1 ml de métadinitrobenzène en solution à 10 % dans la pyridine.

- on ajoute 0,05 ml de KOH 2,5 N

- on agite, bouche et laisse 30 minutes à l'obscurité, puis on refroidit les tubes dans la glace et ajoute 1,5 ml de pyridine-acétate d'éthyle.

On mesure la coloration dans des cuves de 10 mm de trajet optique à 530, 570 et 610 mµ.

La densité optique est donnée par :

$$DO = DO_{570} - \frac{DO_{530} + DO_{610}}{2}$$

Les résultats sont comparés à une courbe étalon obtenue en traitant de la même manière des quantités connues de stéroïde pur.

c) Dosage des corticostéroïdes portant un 20-21 céto par le bleu de tétrazolium (49).

Cette méthode permet de doser de 5-20 µg de corticostéroïde portant un 20-21 céto grâce aux propriétés réductrices de la chaîne latérale qui transforme en milieu alcalin le "bleu de tétrazolium" incolore en formazan coloré.

Réactifs :

solution de bleu de tétrazolium 20 mg/10 ml éthanol 95 %

solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium 10 % Merck
(1 ml/10 ml ethanol 95 %)

On met le stéroïde à sec dans un tube et on ajoute :

- 1,5 ml éthanol 95 %

0,25 ml solution de bleu de tétrazolium

0,25 ml de HTMA

- On laisse les tubes 25 minutes à l'obscurité et à 25° C.

- On arrête la réaction en ajoutant 1 ml d'acide acétique.

L'absorption est mesurée au colorimètre à 470, 510 et 550 mμ.

La densité optique est donnée par :

$$DO = DO_{510} - \frac{(DO_{470} - DO_{550})}{2}$$

et les résultats sont comparés à une courbe étalon.

B - Stéroïdes

1° - Origine, contrôles

Les stéroïdes radioactifs ont été fournis par le CEA, New England Nuclear, the Radiochemical Center, (Amersham, Angleterre) et Tracerlab. Ils ont toujours été chromatographiés sur colonne puis vérifiés par chromatographie sur papier et parfois par recristallisation après dilution isotopique avec du stéroïde de référence.

Les stéroïdes non radioactifs de référence nous ont été fournis par le Dr. D. Fukushima, le Dr. R. Emiliozzi, par Roussel-UCLAF, Merck, Lederle et Ikapharm. Ils ont été vérifiés par chromatographie sur papier et mesure de leur point de fusion.

Les stéroïdes sulfoconjugués radioactifs et certains sulfoconjugués de référence ont été synthétisés dans notre laboratoire. Le sulfate de corticostérone non radioactif a été obtenu grâce au Dr. S. Bernstein et le sulfate de testostérone grâce au Dr. F. Dray. Ces composés étaient régulièrement contrôlés par chromatographie, afin d'éliminer éventuellement les stéroïdes libres qui auraient pu se former.

L'étude de la liaison spécifique des stéroïdes aux protéines plasmatiques n'a pu se faire qu'à de très faibles concentrations de ligand ; il a donc fallu se servir de stéroïdes tritiés de haute activité spécifique. La corticostérone 1,2-H³ (54,7 C/mM) et la testostérone 1,2-H³ (50,0 C/mM) ont été achetées chez Tracerlab, la progestérone 1,2-H³ (20,0 C/mM) chez New England Nuclear et le cortisol 1,2-H³ (2,0 C/mM) au Radiochemical Center (Amersham).

2° - Synthèse des sulfates de stéroïdes et de stérols (36,106)

Le stéroïde (ou stérol) est dissous dans de la pyridine qui a été distillée et conservée sur potasse. On ajoute 10 fois son poids de complexe anhydride sulfurique - pyridine et on laisse reposer à l'abri de l'humidité pendant 2 à 8 jours ; on obtient un meilleur rendement de sulfate de corticostérone lorsque l'incubation est faite à 4°. On évapore ensuite les solvants sous vide dans un dessiccateur et on sépare le sulfate de stéroïde de l'excès de complexe et du stéroïde n'ayant pas réagi par chromatographie sur colonne. Les rendements de cette réaction vont de 20 à 80 %, suivant la structure du composé libre.

C - Comptage des échantillons radioactifs.

Tous les comptages de radioactivité ont été faits dans des spectromètres à scintillation Packard (Tricarb 3325 et 3310) et Intertechnique (SL 40).

1° - Liquides scintillants

a) PPO/POPOP

4-méthyle - 5-phényloxazolyl benzène 100 mg/l (POPOP)

2,5-diphényloxazole 3 g/l (PPO)

toluène 1000 ml

Les stéroïdes neutres sont directement solubles dans le PPO/POPOP ; les stéroïdes sulfoconjugués doivent être dissous préalablement dans 0,2 ml de méthanol ; les comptages sont faits dans 5 ml de PPO/POPOP. Pour les stéroïdes en solution aqueuse, 0,2 ml de solution sont comptés avec 3 ml d'éthanol absolu et 10 ml de PPO/POPOP.

b) Diotol

0,5 ml de solution aqueuse contenant des stéroïdes radioactifs sont comptés dans 15 ml de Diotol :

dioxane 1,75 l

toluène 0,25 l

naphtalène 210 g

PPO 6 g

POPOP 0,2 g

2° - Calculs

a) Rendements de comptage

Les rendements de comptage des spectromètres à scintillation sont mesurés soit à partir du "standard externe", soit en comparant 1) une quantité connue d'isotope livrée dans une fiole

scellée par le constructeur, 2) une fiole contenant une quantité déterminée du même isotope et préparée dans du liquide scintillant pur, donc sans atténuation 3) une fiole contenant la même quantité du même isotope que la fiole 2, mais contenant également l'agent permettant la mise en solution du stéroïde et provoquant une atténuation.

$$\frac{\text{cpm "source"}}{\text{dpm "source"}} \times 100 = \text{rendement de l'appareil}$$

$$\text{cpm 3/cpm 2} = \text{atténuation}$$

$$\text{Rendement/atténuation} = \text{rendement "atténué"}$$

En général, le tritium est compté avec un rendement de 20 à 40 % et le carbone-14 de 50 à 80 %.

b) Double marquage

Les fenêtres de comptage du tritium et du carbone-14 (ou du soufre-35) sont choisies de telle manière qu'il n'y ait pas de tritium compté dans la fenêtre du carbone, et un minimum de carbone compté dans la fenêtre du tritium. Lorsque le spectromètre est équipé d'un standard externe il est facile de déterminer la quantité de carbone-14 passant dans la fenêtre du tritium et de le déduire, sinon il faut mesurer ce passage avec un échantillon de carbone-14 seul, compté dans les mêmes conditions que l'échantillon doublement marqué, puis calculer dans ce dernier la quantité réelle de tritium grâce à la méthode d'Okita (78).

D - Techniques employées pour la préparation et les mesures d'activité de la transcortine.

1° - Préparation des supports de chromatographie et gels de filtration.

DEAE-Cellulose (méthode indiquée par les laboratoires Biorad).

La Cellex D Biorad (cellulose échangeuse d'anions) est mise en suspension dans du tampon phosphate 0,02 M, pH 7,4 (20 g/500 ml), et agitée 15 minutes. On laisse décanter et prélève le surnageant. Cette opération est répétée plusieurs fois pour enlever les particules fines qui ralentissent le débit de la colonne. On coule la cellulose dans des colonnes de 45 x 2,5 cm, en une fois, et lave avec du tampon jusqu'à ce que le pH et la force ionique à l'entrée et à la sortie de la colonne soient identiques. On peut alors déposer la fraction protéique (environ 0,5 g de protéine par g de Cellex D). En fin d'expérience, la Cellex D peut être régénérée par un lavage de 15 minutes dans de la soude 0,2 N, filtration sur Büchner et lavage par l'eau jusqu'à pH 7, puis reprise dans du tampon, etc...

DEAE-Sephadex A-50 (méthode indiquée par la compagnie Whatman).

On fait gonfler la DEAE-Sephadex dans de l'eau distillée pendant une nuit, puis on la lave dans 3 volumes de soude 0,5 N en agitant pendant 30 minutes. On filtre sur Büchner et lave à l'eau jusqu'à pH 7, puis on répète l'opération avec de l'acide chlorhydrique 0,5 N. Le gel est enfin repris dans le tampon d'élution (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,6 contenant KCl 0,09 M), et dégazé sous le vide de la pompe à eau. Lorsqu'il ne contient plus de bulles d'air, le gel est versé en une fois dans une colonne

(Pharmacia, 30 x 2,5 cm) remplie de tampon. On laisse le gel s'écouler et se tasser sans faire couler la colonne, puis on lave avec 250 ml de tampon de départ. L'échantillon protéique, rendu plus dense par l'adjonction de saccharose, est alors déposé doucement au sommet de la colonne à l'aide d'un capillaire.

Hydroxyapatite (99)

L'hydroxyapatite BioGel HTP des laboratoires Biorad est mise en suspension dans 5 volumes de tampon phosphate 0,005 M, pH 6,8, et agitée pendant 20 minutes. On laisse décanter 15 minutes et enlève le surnageant contenant les particules fines. Cette opération, extrêmement importante pour le bon fonctionnement de la colonne, est répétée 5-6 fois. Le phosphate de calcium est ensuite versé dans une colonne (20 x 1 cm) contenant du tampon, et on tasse en laissant s'écouler le tampon. La colonne est lavée abondamment avec du tampon jusqu'à égalité des pH et forces ioniques à l'entrée et à la sortie de la colonne. On peut en général chromatographier 1 mg de protéine par g de support.

L'hydroxyapatite sépare les protéines selon leur teneur en carboxyles (13) ; avec un tampon phosphate de faible force ionique la transcortine est éluée avec le front du solvant et l'albumine est retenue.

Gels de Sephadex (37).

Les gels de Sephadex sont mis en suspension dans du tampon et on les laisse gonfler pendant plusieurs heures. On agite, laisse décanter, enlève le surnageant et remet en suspension plusieurs fois pour enlever les particules fines, puis on dégaze à la pompe à eau (Pour le Sephadex G-25 le dégazage n'est pas nécessaire). Le gel est coulé en une fois, dans une colonne

remplie de tampon et on le laisse se tasser lentement, colonne fermée. Après 24 heures on lave le gel avec le tampon d'élu-tion et on dépose la fraction protéique, équilibrée dans le même tampon (50 mg de protéine pour une colonne de 30 x 2,5 cm). Le volume d'exclusion de la colonne était mesuré en faisant passer sur la colonne 0,5 - 1 ml de bleu de dextran (poids moléculaire : 2×10^6) en solution 0,5 % dans du tampon.

2° - Tampons d'élution

Tampon phosphate de sodium

pH 7,4 : solution mère 0,75 M

A : phosphate monosodique 1,5 M

B : phosphate disodique, 12 H₂O 1,5 M

255 ml A + 245 ml B.....qsp 1000 ml

pH 6,8 : solution mère 0,75 M

95 ml A + 405 ml B.....qsp 1000 ml

Tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,6

A : Tris Base (Sigma, Reagent Grade) 0,2 M

B : acide chlorhydrique 0,1 N

500 ml A + 200 ml B.....qsp 2000 ml

3° - Dosage des protéines

a) Densité optique

En général , pour déterminer la quantité de protéine pré-sente dans une solution, la formule de Kalckar était employée :

$$\text{concentration (mg/ml)} = 1,5 \times \text{D.O. } 280 \text{ mp} - 0,75 \times \text{D.O. } 260 \text{ mp}$$

b) Dosage selon Folin

Dans certains cas, les protéines ont été mesurées par la méthode de Folin, mais les résultats étaient très approximatifs quand on dosait la transcortine purifiée, puisqu'on devait se référer à une courbe étalon établie avec de la sérum-albumine.

Réactif A CO_3Na_2 2 % dans de la soude 0,1 N

B SO_4Cu (5 H_2O) 0,5 % dans du tartrate de sodium et potassium 1 %

C 50 ml de A + 1 ml de B

Dans les tubes contenant 0,5 ml de solution protéique (0,02 - 0,2 mg/ml) on ajoute 0,5 ml de C, on agite et attend 10 minutes. Puis on ajoute 0,2 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (Merck) 1:1 dans l'eau ; on agite et attend 30 minutes, puis on mesure l'absorption à 750 m μ , et détermine la concentration en protéine en se référant à une courbe étalon établie simultanément avec de la sérum-albumine.

4° - Electrophorèse sur bandes de Cellogel (méthode indiquée par Sebia).

0,05 - 0,1 ml de solution contenant 2 - 30 mg de protéine sont déposés à l'aide d'une lamelle de verre sur la bande d'acétate de cellulose (Cellogel Sebia - 2,5 x 17 cm) qui a préalablement trempé dans du tampon pendant 30 minutes.

Tampons d'électrophorèse :

a) tampon véronal sodique pH 8,6

véronal sodique 9,8 g

acétate de sodium 6,48 g

acide chlorhydrique 0,1 N 60 ml

eau distillée qsp 1000 ml

b) tampon acétate 0,02 M pH 5,2

On laisse migrer les protéines pendant 1,5 - 2 heures à 150 V, puis on révèle dans de l'amidoschwarz (0,5 g dans : eau 40 ml / méthanol 50 ml / acide acétique 10 ml) 30 secondes, on décolore dans un mélange de méthanol 35/ eau 50/ acide acétique 7/ diacétonalcool 8 V/V, et on plastifie les bandes à 60° C.

Certaines fractions protéiques ont été incubées 1 - 2 heures avec du cortisol 1,2-H³ (10^{-8} - 10^{-6} M) à 4° C, et 0,05 ml étaient soumis à une électrophorèse, toujours à 4° C. Les bandes de Cello-gel étaient séchées et une moitié découpée en morceaux de 0,5 cm que l'on a comptés dans 10 ml de solution scintillante, l'autre moitié de la bande étant révélée à l'amidoschwarz. (fig 14). Cette méthode permet de déceler dans un mélange un système de liaison dont l'affinité est au moins $10^8 M^{-1}$ (par exemple la liaison du cortisol à la transcortine), mais un système dont l'affinité est de l'ordre de $10^5 M^{-1}$ (par exemple la liaison albumine - cortisol) n'est apparent que lorsqu'il est présent en grande quantité. Cette technique est peu reproductible au point de vue quantitatif, et comme le système n'est pas à l'équilibre, ne permet pas de mesurer la quantité de protéine liante dans le mélange.

5° - Mesure de la liaison ligand-protéine

La liaison ligand-protéine étant une réaction réversible et de faible énergie, il existe un équilibre constant entre les formes associée et dissociée du complexe ligand-protéine. Deux groupes de techniques permettent la mesure de ces liaisons : 1) avec et 2) sans maintien de l'équilibre. Lorsqu'il s'agit de déterminer la valeur d'une constante d'association, il est nécessaire de maintenir l'équilibre (voir 6,b,p.123), et l'on se sert en général de la dialyse à l'équilibre (c). Par contre, lorsqu'on cherche

à séparer le ligand lié à la protéine du ligand non lié, ou de comparer grossièrement les affinités de divers ligands pour une protéine, on peut employer des méthodes où l'équilibre n'est pas maintenu. Dans ce 2ème groupe, nous avons surtout employé la technique de "Murphy" (a), où le stéroïde non lié est rapidement séparé du stéroïde lié à la protéine par adsorption sur du Florisil, mais où le complexe ligand-protéine est partiellement dissocié, et le Sephadex G-25 (b) où le ligand non lié est adsorbé sur le Sephadex.

a) Technique d'adsorption du ligand libre selon Murphy (75)

Le ligand radioactif ($2 \times 10^{-8} \text{M}$) et diverses quantités de compétiteur non radioactif ($0,6 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-6} \text{M}$) sont incubés avec 1 ml de solution protéique (par exemple du plasma dilué 20 fois par du NaCl 0,9 %) pendant 30-60 minutes, à température ordinaire et 10 minutes à 4°C . On ajoute 40 g de Florisil, agite rapidement sur un appareil Vortex pendant 90 secondes^(°), et laisse décanter 10 minutes à 4°C . Le ligand non lié à la protéine étant adsorbé sur le Florisil, le surnageant contient la protéine et le ligand lié, et peut être prélevé et compté. Un blanc traité comme les échantillons mais contenant 1 ml de tampon au lieu de solution protéique indique la quantité de stéroïde non lié qui n'est pas adsorbé sur le Florisil. Ce blanc est assez peu reproductible et limite la sensibilité de la méthode.

Cette technique peut servir à comparer rapidement la compétition de divers ligands pour les sites de liaison d'une protéine et telle qu'elle a été mise au point récemment (76), elle permet le

(°) Ceci est une erreur : il faut agiter lentement le Florisil et les blancs deviennent parfaitement reproductibles (Murphy, communication personnelle, 1970).

dosage spécifique de corticostéroïdes plasmatiques. Elle ne permet pas de mesurer avec précision les constantes d'affinité d'une protéine vis à vis de ses divers ligands.

b) Sephadex G-25 (37)

Pour séparer le stéroïde non-lié du stéroïde lié à une protéine on peut faire passer le mélange sur de courtes colonnes de Sephadex G-25. La protéine portant le ligand lié est exclue du gel et apparaît immédiatement, tandis que le ligand non lié est retenu, plus ou moins longtemps suivant sa structure.

On prépare des petites colonnes de Sephadex G-25 de 15-20 x 0,7 cm dans des pipettes graduées de 5-10 ml. La séparation du stéroïde lié et non lié est moins efficace pour le cortisol (fig. 21) que pour l'oestradiol, par exemple, mais permet d'estimer la quantité de protéine liante présente dans le mélange. Comme le système n'est pas à l'équilibre, bien que sur une colonne très courte la dissociation soit réduite au minimum, on ne peut pas utiliser cette méthode pour des mesures précises de liaison.

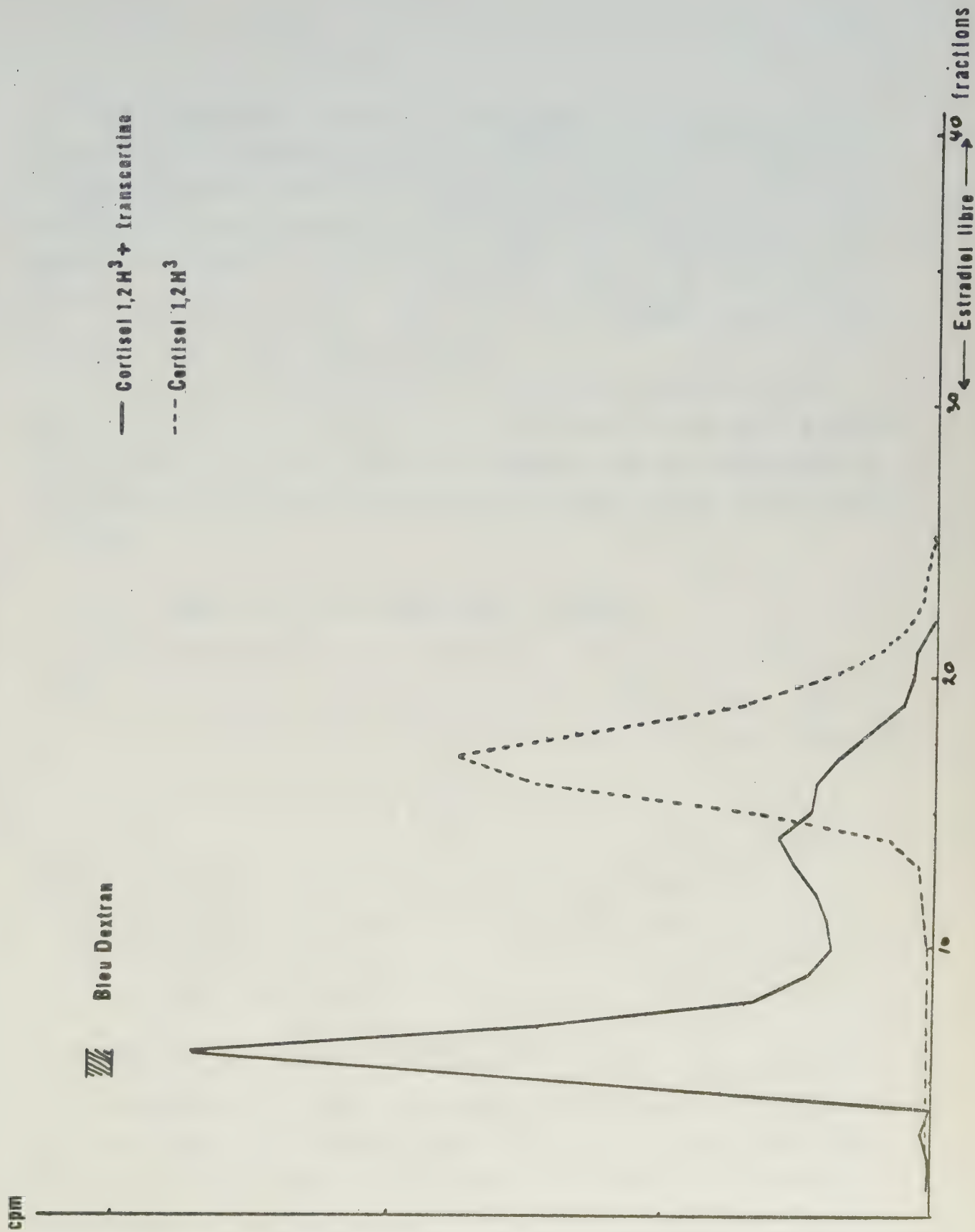
c) Dialyse à l'équilibre

0,5 à 1,5 ml de solution contenant la protéine (0,01 à 0,2 mg/ml selon le degré de pureté) est dialysé dans un sac de cellulose Visking Nojax (8/100 ft.) à 4° C pendant 48-60 heures (temps nécessaire à l'équilibre) contre 15 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 contenant le stéroïde. On n'observe pas d'adsorption des stéroïdes libres sur la membrane de dialyse, mais 6,8 % $\pm$ 1,7 du sulfate de corticostérone disparaissait, probablement adsorbé sur la cellophane.

Figure 21

Séparation sur Sephadex G-25 du cortisol lié
à la transcortine et du cortisol non lié.

SEPHADEX G-25



La transcortine n'est pas dénaturée au cours de la dialyse, et les stéroïdes libres ou sulfoconjugués restent inchangés (vérifié par chromatographie sur papier et sur colonne de célite en fin d'expérience). Comme les sulfatases sont inhibées en présence d'ions phosphates (17), il ne doit pas y avoir d'hydrolyse enzymatique des sulfoconjugués et le pH ne favorise pas l'hydrolyse chimique.

En fin de dialyse, dans la plupart des cas 0,2 ml de la solution à l'intérieur et à l'extérieur du sac sont comptés directement ; on peut également extraire les stéroïdes par la technique de McKenna et compter la totalité de la phase chloroformique

6° - Expression des résultats, calculs.

a) Dans les expériences préliminaires, faites sur du plasma dilué, la liaison, mesurée par dialyse à l'équilibre, a été exprimée en pourcentage de ligand lié, calculé selon Plager (84):

$$\% \text{ lié} = 100 \left(1 - \frac{D \times V_R}{R \times V_D} \right)$$

où R = radioactivité totale à l'intérieur du sac

D = radioactivité totale à l'extérieur du sac

V_R = volume intérieur

V_D = volume extérieur

b) Méthode de Baulieu et Raynaud (12)

Lorsqu'il s'est agit de comparer la liaison du sulfate de corticostérone à la transcortine à celle de la corticostérone libre et de déterminer la constante d'affinité et le nombre maximum de sites de cette protéine pour les deux ligands, la méthode de Baulieu et Raynaud a été employée. Un rappel théori-

que est nécessaire pour pouvoir apprécier les résultats (64).

Lorsqu'une préparation protéique contient un seul système de liaison "spécifique" (de grande affinité et de capacité limitée), si les sites de liaison sont indépendants et si l'équilibre de liaison suit la loi d'action de masse, alors

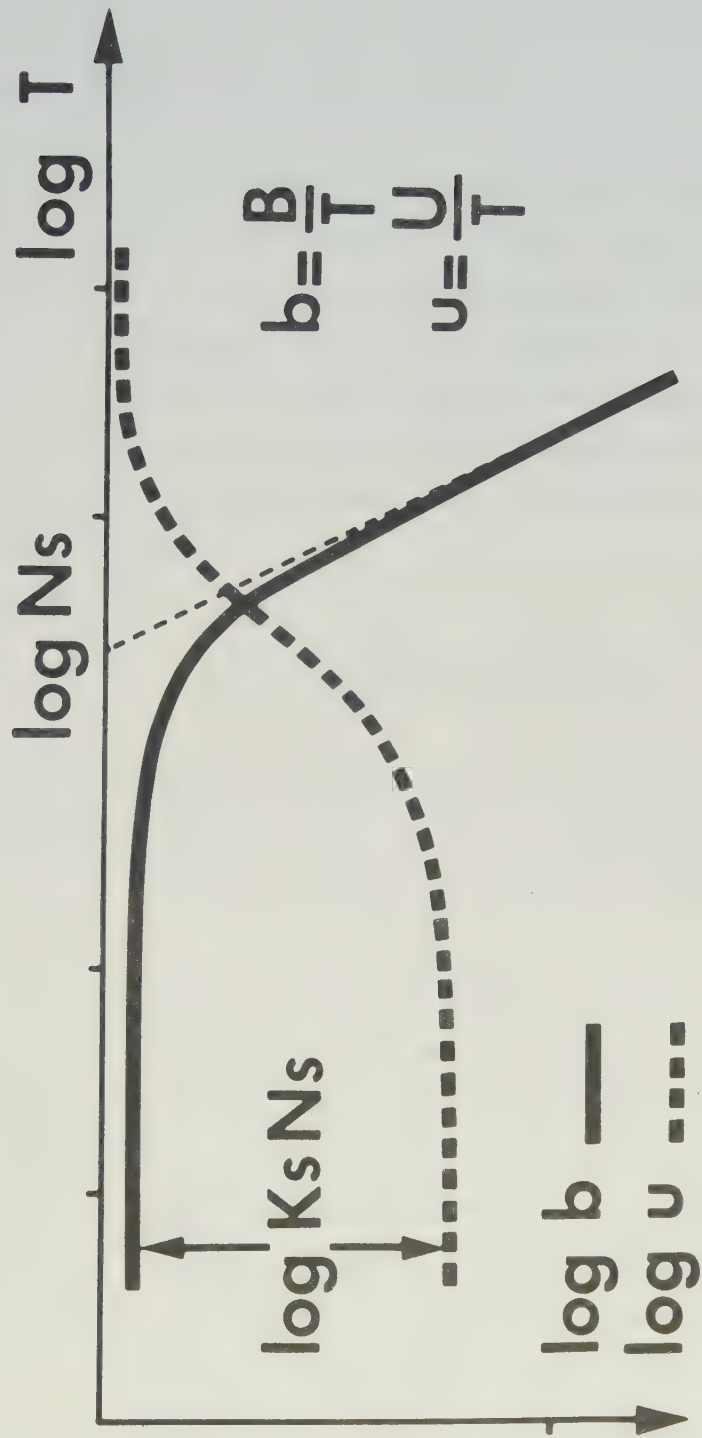
$$B = \frac{(N_S) (U)}{1/K_S + U}$$

où B est le ligand lié, U le ligand non lié, N_S le nombre total de sites et K_S la constante d'association apparente intrinsèque. Tous les paramètres sont calculés à l'équilibre (dialyse).

Les résultats expérimentaux sont représentés graphiquement comme dans la figure 22. En abscisse on porte le logarithme de la concentration totale de ligand dans le sac (T), et en ordonnée les fractions de ligand lié (b) et non lié (u) à l'intérieur du sac de dialyse, exprimés en pourcentage du ligand total intérieur T. L'emploi du logarithme permet de représenter une grande gamme de concentrations de ligand. Au delà du point de saturation de la protéine, b diminue proportionnellement à l'augmentation de T, car le système de liaison spécifique n'intervient plus. Lorsque $T \rightarrow \infty$, $b \rightarrow 0$, et $\log b$ diminue en suivant la droite de dilution isotopique. L'extrapolation de cette droite sur l'axe des abscisses donne $\log N_S$ (car à saturation $B = N_S$, $b = N_S/T$ et donc lorsque $b = 1$, $N_S = T$). Lorsque $T \rightarrow 0$, la limite n'est valable que si $U \ll 1/K_S$, et alors $\log b \rightarrow \log \frac{K_S (N_S)}{1 + K_S N_S}$, ce qui permet de calculer K_S .

Figure 22

Représentation graphique selon Baulieu et Raynaud de la liaison d'un ligand à un système spécifique. Pour les abréviations se référer au texte.



La compétition entre deux ligands pour les sites spécifiques d'une protéine peut également être étudiée par cette méthode. Si l'on dispose des deux ligands sous forme radioactive d'une haute activité spécifique, on peut déterminer séparément la valeur des constantes d'affinité pour chaque ligand comme expliqué ci-dessus (méthode directe) ; par contre si l'un des compétiteurs n'existe que sous forme non radioactive, on peut calculer la constante d'affinité apparente (K_{app}) du ligand radioactif en présence d'une concentration constante (C) du compétiteur non radioactif. On obtient alors la constante d'affinité intrinsèque du compétiteur en appliquant la formule d'Edsall et Wyman (96).

$$K_C = \left(\frac{K_S}{K_{app}} - 1 \right) \times \frac{1}{(C)}$$

Il est important de vérifier le résultat pour diverses concentrations de compétiteur, et l'on doit trouver la même constante d'affinité pour le compétiteur par la méthode "directe" et par compétition.

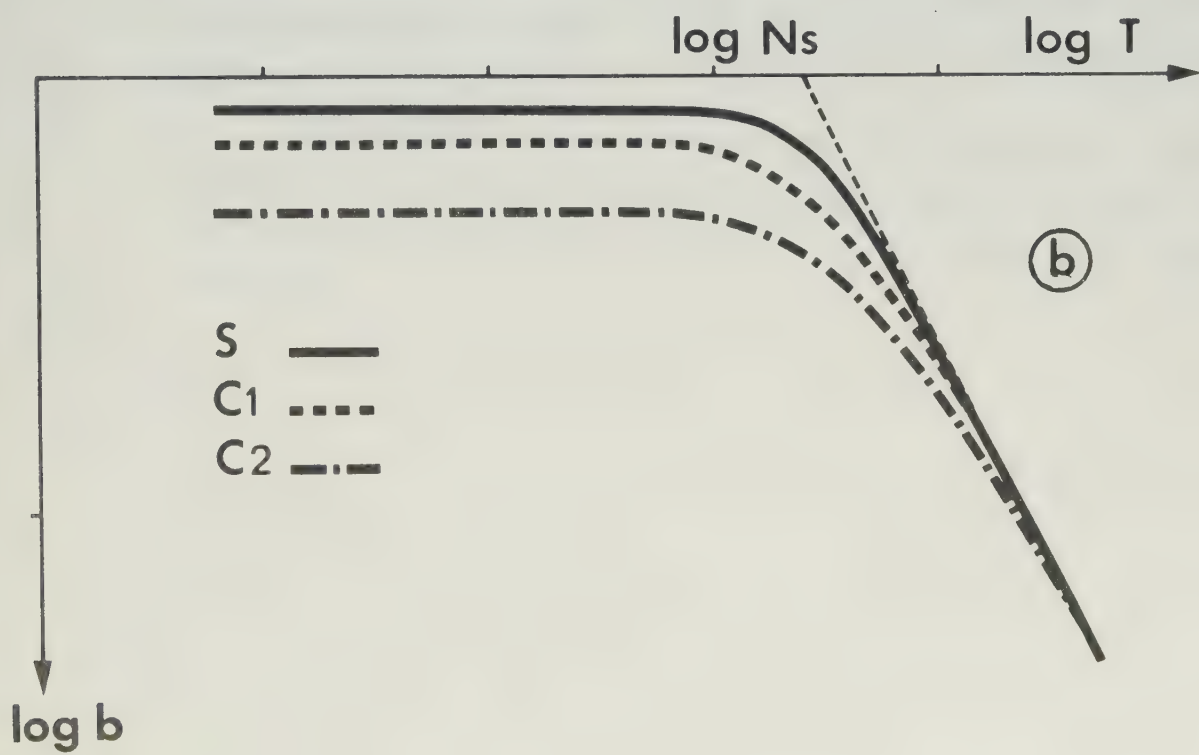
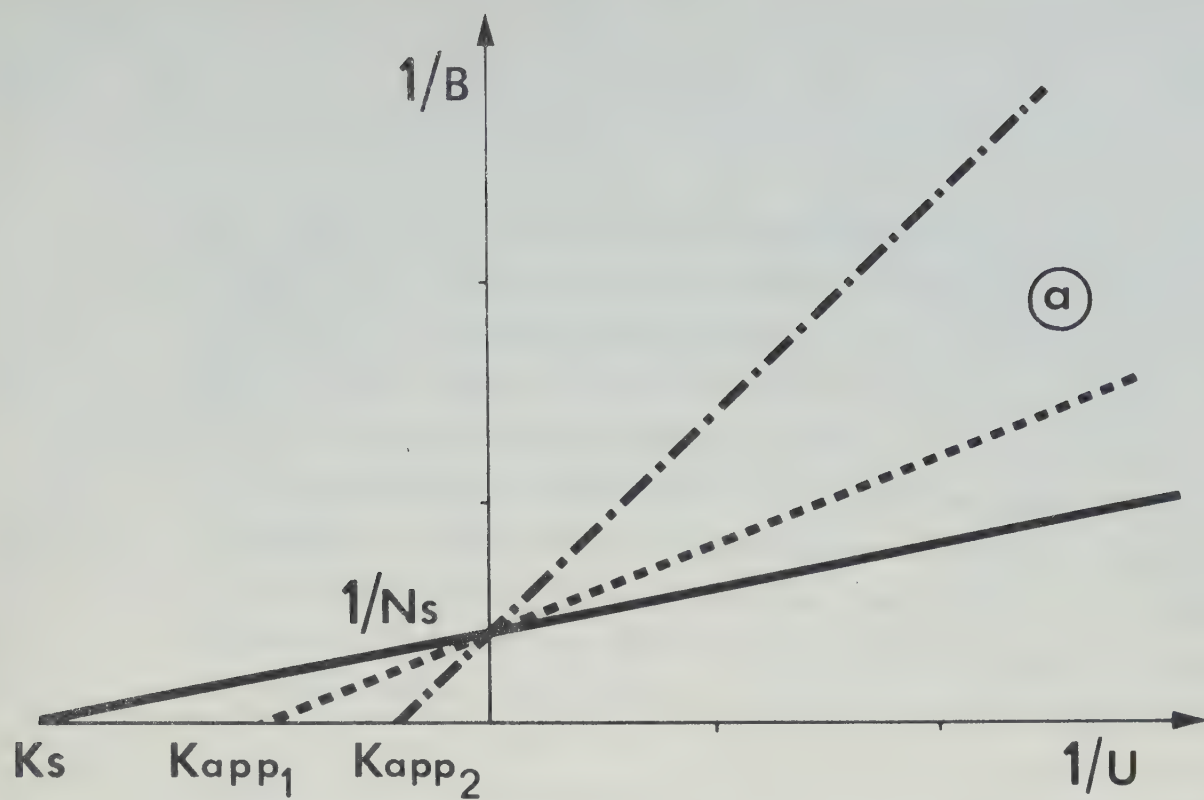
Si les deux ligands compétitionnent pour les mêmes sites, leurs courbes de liaison se rejoignent au delà du point de saturation de la protéine et on trouve donc le même nombre de sites N_S (fig. 23).

Cette représentation graphique permet également de calculer les paramètres de liaison dans une préparation contenant à la fois un ou plusieurs systèmes de liaison spécifiques et un système "non spécifique" (grande capacité, faible affinité, (NS), l'albumine par exemple. Grâce à la représentation logarithmique, et c'est l'avantage de cette méthode graphique par rapport à celles de Scatchard et de Lineweaver - Burk, on étudie la liaison

Figure 23

Représentations de la liaison compétitive d'un composé C au système S.

- a) selon Lineweaver et Burk
- b) selon Baulieu et Raynaud



sur une grande échelle de concentrations, ce qui permet de bien définir la part due au "non spécifique" dans un système de liaison complexe. Cela n'était pas absolument nécessaire pour l'étude des paramètres de la liaison du sulfate de corticostérone à la transcortine, puisque nous avons isolé la protéine spécifique, mais on a pu suivre la purification de la protéine en observant la forme de sa courbe de liaison. La fraction IV de Cohn qui contenait la transcortine et d'autres systèmes de liaison non spécifiques donnait pour la liaison de la corticostérone une courbe de forme S + NS (courbe S + NS fig. 17) ; au cours de la purification la seconde partie de la courbe due au système non spécifique disparaissait pour donner finalement une courbe de type S, due à la transcortine isolée (courbe S, fig. 17).

Les paramètres de liaison ont été déterminés approximativement par la méthode graphique, puis les meilleures valeurs et leurs variances ont été obtenues au moyen d'un ordinateur IBM 360.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - Adams, J.B., Biochim. Biophys. Acta, 71, 243, 1963
- 2 - Adams, J.B., Biochim. Biophys. Acta, 82, 572, 1964
- 3 - Arcos, M., Gulpide, E., Vande Wiele, R. and Lieberman, S.,
J. Clin. Endocr. Metab., 24, 237, 1964
- 4 - Banerjee, R.K. and Roy, A.B., Mol.Pharm., 2, 56, 1966
- 5 - Baulieu, E.E., C.R. Acad. Sci. Paris, 251, 1421, 1960
- 6 - Baulieu, E.E., J. Clin. Endocr. Metab, 22, 501, 1962
- 7 - Baulieu, E.E., Thèse de Sciences, Paris 1963
- 8 - Baulieu, E.E., Corpéchet, C. and Emiliozzi, R., Steroids,
2, 429, 1963
- 9 - Baulieu, E.E. and Dray, F., J. Clin. Endocr. Metab. 23,
1298, 1963
- 10 - Baulieu, E.E., Corpéchet, C., Dray, F., Emiliozzi, R.,
Lebeau, M.C., Mauvais-Jarvis, P. and Robel, P., Rec. Progr.
Horm. Res., Acad. Press, G. Pincus ed, 21, 411, 1965
- 11 - Baulieu, E.E., Milgrom, E., Lebeau, M.C., Mercier-Bodard, C.,
Weintraub, H. and Robel, P., Adv. in Biosciences 2, Schering
Symp. Berlin 1968, p. 145
- 12 - Baulieu, E.E. and Raynaud, J.P., Europ. J. Biochem., 13,
293, 1970
- 13 - Bernardi, G. and Kawasaki, T., Biochim. Biophys. Acta, 160,
301, 1968
- 14 - Bloch, K., J. Biol. Chem., 157, 661, 1945
- 15 - Boström, H. and Wengle, B., Acta Endocr., 56, 691, 1967
- 16 - Burstein, S., Lieberman, S., J. Am. Chem. Soc., 80, 5235,
1958
- 17 - Burstein, S. and Dorfman, R.I., J. Biol. Chem, 238, 1656, 1963

- 18 - Calvin, H.I., Vande Wiele, R. and Lieberman, S.,
Biochemistry, 2, 648, 1963
- 19 - Calvin, H.I. and Lieberman, S., Biochemistry, 3, 259, 1964
- 20 - Cavina, G., Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 31, 1666, 1955
- 21 - Chaudhuri, A.C., Harada, Y., Shimizu, K., Gut, M. and
Dorfman, R.I., J. Biol. Chem., 237, 703, 1962
- 22 - Chevallier, F., Arch. Sci. Physiol., 10, 249, 1956
- 23 - Chobanian, A.V. and Hollander, W., J. Clin. Invest, 41,
1732, 1962
- 24 - Claude, J.R. and Beaumont, J.L., Ann. Biol. Clin., 22,
815, 1964
- 25 - Cohn, G.L., Mulrow, P.J. and Dunne, V.C., J. Clin. Endocr.
Metab., 23, 671, 1963
- 26 - Crépy, O., non publié
- 27 - Dailey, R.E., Swell, L. and Treadwell, C.R., Arch. Biochem.
Biophys., 100, 360, 1963
- 28 - De Meio, R.H. and Lewycka, C., Endocrinology, 56, 489, 1955
- 29 - De Moor, P., Deckx, R. and Steeno, O., J. Endocrinol., 27,
355, 1966
- 30 - Dixon, R., Vincent, V. and Kase, N., Steroids, 6, 757, 1965
- 31 - Dorfman, R.I., Sharma, D.C., Steroids, 6, 229, 1965
- 32 - Drayer, N.M., Roberts, K.D., Bandi, L. and Lieberman, S.,
J. Biol. Chem., 239, PC 3112, 1964
- 33 - Drayer, N.M. and Lieberman, S., Biochem. Biophys. Res. Com.,
18, 126, 1965
- 34 - Drayer, N.M. and Lieberman, S., J. Clin. Endocr. Metab.,
27, 136, 1967
- 35 - Edwards, R.W.H., Kellie, A.E. and Wade, A.P., Mem. Soc. Endo-
crinol., 2, 53, 1963
- 36 - Emiliozzi, R., Bull. Soc. Chim. France, p. 911, 1960

- 37 - Flodin, P. and Killander, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 403, 1962
- 38 - Fukushima, D.K., Bradlow, H.L., Hellman, L. and Gallagher, T.F., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 23, 266, 1963
- 39 - Griffiths, K., Grant, J.K., Symington, T., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 23, 776, 1963
- 40 - Gual, C., Rojo, B., Lemus, A.E., Rivera, R., *Soc. Mex. de Nutricion y Endocrinol. IIIrd Meeting*, p. 126, 1962
- 41 - Gual, C., Sanchez, J., Dorfman, R.I. and Rosenthal, I.M., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 22, 1040, 1962
- 42 - Guillemin, R., Clayton, G.W., Smith, J.D. and Lipscomb, H.S., *Endocrinology*, 63, 349, 1958
- 43 - Gurpide, E., Angers, M., Vande Wiele, R. and Lieberman, S., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 22, 935, 1962
- 44 - Gurpide, E., Roberts, K.D., Welch, M.T., Bandi, L. and Lieberman, S., *Biochemistry*, 5, 3352, 1966
- 45 - Hall, P.F. and Koritz, S.B., *Endocrinology*, 75, 135, 1964
- 46 - Harper, M.J.K., *Endocrinology*, 84, 229, 1969
- 47 - Hellman, L., Bradlow, H.L., Zumoff, B., Fukushima, D.K. and Gallagher, T.F., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 19, 936, 1959
- 48 - Jarrige, P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45, 761, 1963
- 49 - Jayle, M.F., *Analyse des Steroïdes Hormonaux*, Masson et Cie, ed tome I et II, 1962
- 50 - Jost, A., *Rec. Progr. Horm. Res.*, 22, 541, 1966
- 51 - Kahnt, F.W., and Neher, R., *Helvetica Chem. Acta*, 48, 1457, 1965
- 52 - Kamoun, A., Mialhe-Volosse, C. et Stutinsky, F., *C.R. Soc. Biol.*, CL VIII, 828, 1964
- 53 - Karush, F., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2714, 1950

- 54 - Kielmann, N., Stachenko, J. and Giroud, C.J.P.,
Steroids, 8, 993, 1966
- 55 - Killinger, D.W. and Solomon, S., J. Clin. Endocr. Metab.,
25, 290, 1965
- 56 - Klein, G.P. and Giroud, C.J.P., Steroids, 5, 765, 1965
- 57 - Klein, G.P. and Giroud, C.J.P., Steroids, 9, 113, 1967
- 58 - Krum, A.A., Morris, M.D. and Bennett, L.L., Endocrinology,
74, 543, 1964
- 59 - Lakshmanan, T.K. and Lieberman, S., Arch. Biochem. Biophys.,
53, 258, 1954
- 60 - Lebeau, M.C. and Baulieu, E.E., Endocrinology, 73, 832, 1963
- 61 - Lebeau, M.C. et Baulieu, E.E., C.R. Acad. Sci. Paris, 258,
6265, 1964
- 62 - Lebeau, M.C., Alberga, A. and Baulieu, E.E., Biochem. Biophys.
Res. Com., 17, 570, 1964
- 63 - Lebeau, M.C. et Baulieu, E.E., C.R. Acad. Sci. Paris, 263,
158, 1966
- 64 - Lebeau, M.C., Mercier-Bodard, C., Olds, J., Bourquin, D.,
Brécy, T., Raynaud, J.P. et Baulieu, E.E., Ann. Endocr. Paris,
30, 183, 1969
- 65 - Lebeau, M.C. and Baulieu, E.E., J. Clin. Endocr. Metab., 30,
166, 1970
- 66 - Lieberman, S. and Dobriner, K., Rec. Progr. Horm. Res., 3, 71,
1948
- 67 - McKenna, J. and Norymberski, J.K., Biochem. J., 76, 1x, 1960
- 68 - Melby, J., Wilson, T. and Dale, S., J. Clin. Invest, 43,
1282, 1964
- 69 - Migeon, C.J. and Plager, J.E., J. Biol. Chem., 209, 767, 1954
- 70 - Milgrom, E. et Baulieu, E.E., C.R. Acad. Sci. Paris, 266,
1529, 1968

- 71 - Moser, H.W., Moser, A.B. and Orr, J.C., Biochim. Biophys. Acta, 116, 146, 1966
- 72 - Muldoon, T.G. and Westphal, U., J. Biol. Chem., 242, 23, 1967
- 73 - Mulrow, P.J., Cohn, G.L. and Kuljian, A., J. Clin. Invest., 41, 1584, 1962
- 74 - Munson, P.L., Gallagher, T.F. and Koch, F.C., J. Biol. Chem., 152, 67, 1944
- 75 - Murphy, B.E.P., J. Clin. Endocr. Metab., 27, 973, 1967
- 76 - Murphy, B.E.P., Karonlinska Symp. on Res. Meth. of Reprod. Endocr., IInd Symp. 1970, à paraître
- 77 - Nose, Y. and Lipmann, F., J. Biol. Chem., 233, 1348, 1958
- 78 - Okita, G.T., Kabara, J.J., Richardson, F. and Leroy, G.V., Nucleonics, 15, 111, 1957
- 79 - Pasqualini, J.R., Bull. Soc. Chim. Biol., 45, 277, 1963
- 80 - Pasqualini, J.R., J. Clin. Endocr. Metab., 27, 885, 1967
- 81 - Pasqualini, J.R., Endocr. Soc. Meeting, 1967, p. 149, abst.241
- 82 - Peterson, R.E., Rec. Progr. Horm. Res., 15, 231, 1959
Acad. Press, G. Pincus, ed.
- 83 - Pidacks, E., Gordon Res. Conf. on Sep. and Purif., 1961,
New London, N.H.
- 84 - Plager, J.E., J. Clin. Invest., 44, 1234, 1965
- 85 - Puche, R.C. and Nes, W.R., Endocrinology, 70, 857, 1962
- 86 - Raggatt, P.R. and Whitehouse, M.W., Biochem. J., 101, 819, 1966
- 87 - Rice, L.I., Rice, E.H., Spolter, L., Marx, W. and O'Brien, J.S.
Arch. Biochem. Biophys., 127, 37, 1968
- 88 - Riley, C., Biochem. J., 87, 500, 1963
- 89 - Roberts, K.D., Vande Wiele, R. and Lieberman, S., J. Clin. Endocr. Metab., 21, 1522, 1961
- 90 - Roberts, K.D., Vande Wiele, R. and Lieberman, S., J. Biol. Chem., 236, 2213, 1961

- 91 - Roberts, K.D., Bandi, L., Calvin, H.I., Drucker, W.D.
and Lieberman, S., Biochemistry, 3, 1983, 1964
- 92 - Roberts, K.D., Bandi, L. and Lieberman, S., Biochem. Biophys.
Res. Com., 29, 741, 1967
- 93 - Rosenberg, R.M. and Klotz, I.M., Analytical Methods of Pro-
tein Chemistry, P. Alexander and R.J. Block, eds.,
Pergamon Press, tome 2, p. 131, 1960
- 94 - Roy, A.B., Adv. Enzymol. Nord FF ed. Interscience N.Y., 22
205, 1960
- 95 - Sandberg, A., Gurpide, E. and Lieberman, S., Biochemistry,
3, 1256, 1964
- 96 - Sandberg, A., Rosenthal, H., Schneider, S.L. and Slaunwhite Jr
W.R., Steroid Dynamics, G. Pincus, ed., Acad. Press
p. 1, 1966
- 97 - Saroff, J., Slaunwhite, W.R., Costa, G. and Sandberg, A.,
J. Clin. Endocr. Metab., 23, 629, 1963
- 98 - Savard, K., Dorfman, R.I., Baggett, B., Fielding, L.L.,
Engel, L.L., Mc Pherson, H.T., Lister, L.M., Johnson, D.S.,
Hamblen, E.C. and Engel, F.L., J. Clin. Invest, 39, 534, 1960
- 99 - Seal, U.S. and Doe, R.P., J. Biol. Chem., 237, 3136, 1962
- 100 - Siiteri, P.K., Vande Wiele, R. and Lieberman, S., J. Clin.
Endocr. Metab., 23, 588, 1963
- 101 - Siiteri, P.K., Steroids, 2, 687, 1963
- 102 - Siiteri, P.K. and Mac Donald, P.C., Steroids, 2, 713, 1963
- 103 - Shimizu, K., Gut, M. and Dorfman, R.I., J. Biol. Chem., 237,
699, 1962
- 104 - Schneider, J.J. and Lewbart, M., J. Biol. Chem., 222, 787,
1956.
- 105 - Schweitzer, M., Branchaud, C. and Giroud, C.J.P., Steroids,
14, 519, 1969
- 106 - Sobel, A.E. and Spoerri, P.E., J. Am. Chem. Soc., 63, 1259
1941
- 107 - Solomon, S., Carter, A. and Lieberman, S., J. Biol. Chem.,
235, 351, 1960

- 108 - Solomon, S., Bird, E., Wilson, R., Wiggvist, N. and
Diczfalusy, E., Proc. Inter. Congr. Endocrinol., London
Part II, p. 721, 1964
- 109 - Staple, E., Lynn, W.S. and Gurin, S., J. Biol. Chem.,
219, 845, 1956
- 110 - Wallace, E.Z. and Lieberman, S., J. Clin. Endocr. Metab.,
23, 901, 1963
- 111 - Wang, D.Y. and Bulbrook, R.D., J. Endocrinol., 39, 405,
1967
- 112 - Weliky, I. and Engel, L., J. Biol. Chem., 237, 2089, 1962
- 113 - Weliky, I. and Engel, L., J. Biol. Chem., 238, 1303, 1963
- 114 - Wengle, B. and Boström, H., Acta Chem. Scand., 16, 502, 1962
- 115 - Wengle, B. and Boström, H., Acta Chem. Scand., 17, 1203,
1963
- 116 - Wengle, B. and Boström, H., Acta Societatis Medicorum
Upsaliensis, 69, 41, 1964
- 117 - Werbin, H. and Chaikoff, I., Arch. Biochem. Biophys., 93,
476, 1961
- 118 - Westphal, U., Mechanism of Action of Steroid Hormones,
Viltee, C., Engel, L. Eds., 1961, p. 33
- 119 - Westphal, U., Z. Physiol. Chim., 346, 243, 1966
- 120 - Wieland, R.G., Levy, R.P., Katz, D. and Hirschmann, H.,
Biochim. Biophys. Acta, 78, 566, 1963
- 121 - Wieland, R.G., de Courcy, C., Levy, R.P., Zala, A.P. and
Hirschmann, H., J. Clin. Invest, 44, 159, 1965
- 122 - Winter, J.S.D. and Bongiovanni, A.M., J. Clin. Endocr.
Metab., 28, 927, 1968
- 123 - Young, D.G. and Hall, P.F., Endocrinology, 82, 291, 1968
- 124 - Young, D.G., and Hall, P.F., Biochem. Biophys. Res. Com.,
31, 925, 1968

TABLE DES MATIERES

	Page
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I.</u> Sulfoconjugaison des stéroïdes dans les glandes surrénales.	
A - Sulfoconjugaison de stéroïdes <u>in vitro</u> par la fraction soluble d'un homogénat de tumeur surrénale.	6
B - Préparation de stéroïdes sulfoconjugués radioactifs.	11
<u>CHAPITRE II.</u> Mise en évidence de stéroïdes sulfoconjugués dans les tissus normaux.	
A - Sulfate de cholestérol dans le plasma humain.	15
B - Sulfate de corticostérone dans l'urine, le tissu surrénalien et le plasma de l'Homme.	16
1° - dans l'urine	18
2° - dans le tissu surrénalien	21
3° - dans le plasma	
4° - demi-vie du sulfate de corticostérone dans le plasma.	23
C - Sulfate de corticostérone dans le plasma et le tissu surrénalien du Rat à la naissance.	28
<u>CHAPITRE III.</u> Sulfates de stéroïdes et biosynthèse surrénalienne des hormones chez l'Homme.	32
A - Métabolisme <u>in vitro</u> de la 17-hydroxyprégnénolone et de son sulfate dans du tissu tumoral surrénalien.	33
B - Métabolisme du sulfate de cholestérol	41
1° - Métabolisme <u>in vitro</u> du cholestérol et du sulfate de cholestérol dans du tissu tumoral testiculaire.	42
2° - Métabolisme <u>in vitro</u> du cholestérol et du stéarate de cholestérol dans du tissu tumoral surrénalien.	46
3° - Métabolisme <u>in vivo</u> du cholestérol et de son sulfate.	56

<u>CHAPITRE IV.</u> Mise en évidence des interactions de certains stéroïdes sulfoconjugués avec la transcortine humaine.	73
A - Liaison du sulfate de corticostérone aux protéines plasmatiques.	76
1° - Dialyse à l'équilibre.	
2° - Technique d'adsorption du ligand libre selon Murphy.	
B - Purification de la transcortine.	80
C - Liaison du sulfate de corticostérone à une préparation partiellement purifiée de transcortine.	88
D - Liaison du sulfate de corticostérone à la transcortine purifiée.	88
<u>CONCLUSION.</u>	96
<u>TECHNIQUES.</u>	
A - Techniques employées pour l'étude du métabolisme des stéroïdes.	100
1° - Solvants	
2° - Adsorbants pour chromatographie sur colonne.	
3° - Méthodes d'extraction des stéroïdes	
a) stéroïdes conjugués	
extraction selon Kellie	
extraction selon McKenna et Norymberski	
b) extraction des stéroïdes conjugués urinaires	
suivie d'hydrolyse séquentielle de sulfo et glurucoconjugués.	
4° - Hydrolyse des sulfoconjugués	
a) hydrolyse enzymatique	
b) solvolysse	
5° - Partage benzène-eau	
6° - Réaction de Girard	

7° - Réduction par le borohydrure de sodium	
8° - Acétylation	
9° - Chromatographie sur colonne	
a) chromatographie d'adsorption	
sur Florisil	
sur silice-célite	
sur alumine	
b) chromatographie de partage	
colonne de célite	
systèmes de solvants	106
10° - Chromatographie sur papier	
systèmes de solvants	107
11° - Chromatographie sur couche mince	
12° - Dosages	
a) par l'anhydride acétique marqué	
b) méthode colorimétrique "microzimmerman"	
c) méthode colorimétrique au bleu de tétrazolium	
B - Stéroïdes	111
1° - origine, contrôles	
2° - synthèse de sulfoconjugués	
C - Comptage des échantillons radioactifs.	113
D - Techniques pour la préparation et mesure d'activité de la transcortine.	115
1° - Préparation des supports de chromatographie et gels de filtration	
2° - tampons d'élution	
3° - dosage des protéines	
4° - électrophorèse sur acétate de cellulose	
5° - mesure de la liaison ligand-protéine	
6° - expression des résultats, calculs.	

TABLE DES FIGURES

n°	page
1. Biosynthèse surrénalienne et sécrétion des stéroïdes et de leurs sulfoconjugués.	3
2. Sulfate de corticostérone- H^3 : chromatographie sur colonne de célite dans le système H.	12
3. Sulfate- S^{35} de corticostérone- H^3 : purification sur colonne de célite dans le système H.	14
4. Purification de l'acétate de corticostérone	24
5. Disparition du sulfate de corticostérone dans le plasma.	25
6. Incubations 2 et 3 : chromatographie sur colonne de célite dans les systèmes A (A et C) et H (B).	A : 53 B+C : 54
7. Elimination urinaire des métabolites du sulfate de cholestérol- H^3 et contribution du cholestérol et de son sulfate aux métabolites urinaires glucuroconjugués.	59
8. Biosynthèse et métabolisme des hormones stéroïdes à partir du cholestérol et du sulfate de cholestérol.	61
9. Rapport H^3/C^{14} dans les métabolites urinaires purifiés des stéroïdes surrénaliens.	69
10. Compétition entre la corticostérone 1,2- H^3 et des compétiteurs non radioactifs (O_I , SD, B) pour la liaison au plasma 5%.	78
11. Liaison de la corticostérone 1,2- H^3 au plasma 5 % en présence de compétiteurs non radioactifs (ST, T, SB, F, B)	79
12. Purification de la fraction IV de Cohn sur DEAE-cellulose après incubation avec de la corticostérone 1,2- H^3 .	81

13. Electrophorèse sur cellogel de fractions contenant de la transcortine après purification partielle sur DEAE cellulose et DEAE Sephadex. 82
14. Electrophorèse de fractions partiellement purifiées de transcortine. 83
15. Purification de la transcortine incubée avec de la corticostérone 1,2- H^3 sur DEAE Sephadex. 85
16. Purification de la transcortine incubée avec de la corticostérone 1,2- H^3 sur Hydroxyapatite. 86
17. Liaison de la corticostérone 1,2- H^3 à la fraction IV de Cohn. 87
18. Liaison de la corticostérone 1,2- H^3 à des fractions partiellement purifiées de transcortine en présence de compétiteurs non radioactifs. 89
19. Liaison de la corticostérone 1,2- H^3 à la transcortine à deux concentrations différentes de protéine. 91
20. Liaison de la corticostérone 1,2- H^3 et du sulfate de corticostérone à la transcortine ; étude "directe" et par compétition. 93
21. Séparation sur Sephadex G-25 du cortisol lié à la transcortine et du cortisol non lié. 122
22. Représentation graphique selon Baulieu et Raynaud de la liaison d'un ligand à un système spécifique. 125
23. Représentations de la liaison compétitive d'un composé C au système S.
 - a) selon Lineweaver-Burk
 - b) selon Baulieu et Raynaud. 127

